



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 124 729** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **G 01 N 33/53**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95118163/14, 31.03.1994  
(30) Приоритет: 31.03.1993 US 08/040,430  
(46) Дата публикации: 10.01.1999  
(56) Ссылки: WO 92/21977 A1, 10.12.92. US 4981786 A, 01.01.91.  
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 31.10.95  
(87) Публикация РСТ:  
WO 94/23300 (13.10.94)  
(98) Адрес для переписки:  
193036 Санкт-Петербург, а/я 24, НЕВИНПАТ  
Поликарпову А.В.

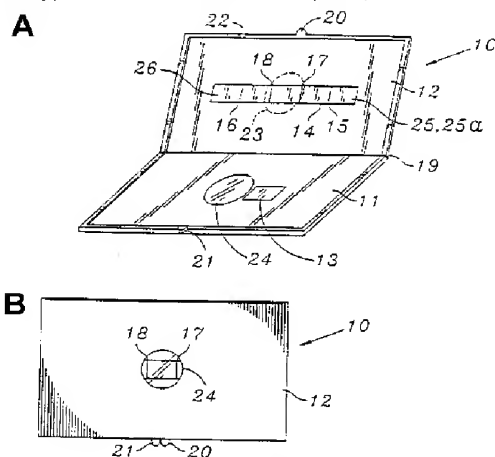
(71) Заявитель:  
Смит Клайн Дайагностикс, Инк. (US)  
(72) Изобретатель: Чейндлер Хауард М. (US),  
Пьясио Роджер Н. (US), Праути Кэрен (US)  
(73) Патентообладатель:  
Смит Клайн Дайагностикс, Инк. (US)

(54) УСТРОЙСТВО ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И/ЛИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНАЛИТА В ОБРАЗЦЕ (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Устройство для хроматографического анализа, используемое для иммуноанализов, позволяет проводить быстрые и удобные анализы биологически важных аналитов и выполнять необходимые экстракции in situ без использования отдельного оборудования для экстракции. Устройство обладает широким динамическим диапазоном и защищено от влияния частиц или окрашенных компонентов. В одной из форм устройство включает в себя первый противоблок, содержащий зону приготовления образца, приспособленную для получения исследуемого образца, и второй противоблок, содержащий хроматографическую среду. Первый и второй противоблоки могут быть установлены друг против друга с тем, чтобы прикладыванием к хроматографической среде зоны приготовления образца перенести в нее исследуемый образец. Предпочтительно, когда аналит обнаруживается с помощью визуальной детектируемой метки. Другие варианты устройства отличаются расположением блоков с целью обеспечения оптимальной хроматографии ряда аналитов, а также осуществления двунаправленной хроматографии; последующие варианты

оказываются подходящими для проведения конкурентных иммуноанализов. Указанные устройства могут быть включены в состав наборов для анализа, также раскрыты возможности использования этих устройств в таких методах анализа, как сэндвич и конкурентный. 10 с. и 25 з.п.ф-лы, 28 ил.



Фиг.1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 124 729** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **G 01 N 33/53**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95118163/14, 31.03.1994  
(30) Priority: 31.03.1993 US 08/040,430  
(46) Date of publication: 10.01.1999  
(85) Commencement of national phase: 31.10.95  
(87) PCT publication:  
WO 94/23300 (13.10.94)  
(98) Mail address:  
193036 Sankt-Peterburg, a/ja 24, NEVINPAT  
Polikarpovu A.V.

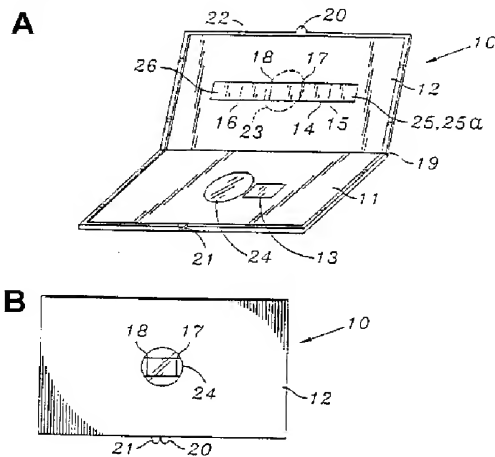
(71) Applicant:  
Smit Klajn Dajagnostiks, Ink. (US)  
(72) Inventor: Chejndler Khauard M. (US),  
P'jasio Rodzher N. (US), Prauti Kehen (US)  
(73) Proprietor:  
Smit Klajn Dajagnostiks, Ink. (US)

(54) **DEVICE FOR CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS FOR DETECTING AND/OR DETERMINING ANALYTE IN SAMPLE (VERSIONS)**

(57) Abstract:

FIELD: analytical methods. SUBSTANCE: chromatographic analysis device designed for performing immunoassays permits to rapidly analyze biologically important analytes and to fulfill required extractions in situ with no use of special extraction equipment. Device has extended dynamic range and is protected against influence of particles and colored components. In one embodiment of invention, device comprises first counter-block containing sample-preparation zone appropriate for preparing test sample and second counter-block containing chromatographic medium. The first and second counter-blocks can be oppositely positioned so that, when sample-preparation zone is brought into contact with chromatographic medium, test sample is transferred into the latter. Analyte is preferably detected by means of visually detectable label. Other versions of device differ by arrangement of units ensuring optimal chromatography of a series of analytes and also bidirectional chromatography. Consequent versions proved

to be appropriate for performing competitive immunoassays. EFFECT: enabled inclusion of device into a series of analytical kits, and possibility of using device in sandwich and competitive methods are evidenced.



Фиг.1

Это изобретение касается тест-полосок, служащих для определения характеристик образцов, унифицированных корпусов и наборов, включающих тест-полоски и корпуса, а также методов определения характеристик образцов, в которых используются эти тест-полоски и корпуса.

Среди большого количества аналитических систем, применяемых для обнаружения и/или определения аналитов, в частности, биологически важных аналитов, существуют системы хроматографического анализа. Аналиты, часто исследуемыми с помощью таких систем, являются:

(1) гормоны, такие как хорионный гонадотропин человека (hCG), часто анализируемый как маркер беременности человека;

(2) антигены, в частности антигены, специфичные к бактериальным и вирусным патогенам, таким как *Streptococcus* и вирус гепатита, и патогенам простейших, например *Giardia*;

(3) антитела, в частности антитела, индуцированные в результате инфекции патогенами, такие как антитела к бактерии *Helicobacter pylori* и к вирусу иммунодефицита человека (HIV);

(4) другие белки, такие как гемоглобин, часто анализируемый при определении фекальной скрытой крови - индикатора на ранних стадиях таких заболеваний желудочно-кишечного тракта, как рак толстой кишки;

(5) ферменты, такие как аспартатаминотрансфераза, лактат-дегидрогеназа, щелочная фосфатаза и глутаматдегидрогеназа, часто анализируемые как индикаторы физиологической функции и повреждения ткани;

(6) лекарства как терапевтического действия, такие как антибиотики, транквилизаторы и противосудорожные средства, так и незаконные лекарства, приводящие к злоупотреблению ими, такие как кокаин, героин и марихуана;

(7) вещества, загрязняющие окружающую среду, такие как пестициды и ароматические углеводороды, и

(8) витамины.

Подобные хроматографические системы часто используются врачами и другими медицинскими работниками для быстрого установления диагноза и терапевтического мониторинга состояния здоровья и разнообразных заболеваний. Они также все чаще применяются самими пациентами для домашнего мониторинга состояния здоровья и заболеваний.

Наиболее значимыми системами такого вида являются "тонкослойные" системы, в которых растворитель движется через тонкую и плоскую среду абсорбента.

К наиболее важным исследованиям, которые могут быть выполнены с помощью таких тонкослойных систем, относятся иммуно-анализы, которые зависят от взаимодействия между антигеном или гаптеном и соответствующим антителом. Факт использования иммуноанализов как способа исследования наличия и/или количества клинически важных молекул известен уже в течение некоторого времени. Еще в 1956 году J.M. Singer докладывал об использовании метода агглютинации латекса, основанного на

иммунном ответе, для обнаружения фактора, связанного с ревматоидным артритом [1].

Среди хроматографических технических приемов, применяемых вместе с иммуноанализами, существует процедура, известная как иммунохроматография. Обычно в основе этой техники лежит применение обнаруживающего реагента или частицы, которые соединены с антителом к исследуемой молекуле с образованием конъюгата. Затем этот конъюгат смешивают с образцом и, если анализируемая молекула присутствует в образце, то антитела, соединенные с обнаруживающим реагентом, связываются с анализируемой молекулой, тем самым указывая на ее наличие. Обнаруживающий реагент или частицу можно идентифицировать по окраске, магнитным свойствам, радиоактивности, по специфической реакции с другой молекулой или по другим физическим или химическим свойствам. В зависимости от природы анализируемой молекулы и исследуемого образца используются различные реакции обнаружения.

Иммунохроматографические анализы подразделяются на две принципиальные категории: "сэндвич" и "конкурентные", в соответствии с природой комплекса антиген-антитело, который нужно обнаружить, и последовательности реакций, необходимых для образования этого комплекса. Антиген, который необходимо обнаружить, сам может являться антителом, как, например, в серологических анализах для специфичного к *H. pylori* антитела. В таких случаях исследуемое антитело может быть связано со специфическим антигеном. В альтернативном случае антиген, который надо обнаружить, может быть обнаружен косвенным путем, используя меченое второе антитело, связывающееся с первым антителом к определяемому аналиту.

Обычно для осуществления сэндвич иммунохроматографии образец, в котором может содержаться исследуемый аналит, смешивают с антителами к этому аналиту. Эти антитела мобильны и обычно связаны с меткой или обнаруживающим реагентом, как например окрашенный латекс, коллоидный металлический золь или радиоизотоп. Затем эта смесь помещается в хроматографическую среду, содержащую полосу или зону иммобилизованных антител к интересующему аналиту. Хроматографическая среда часто бывает выполнена в форме полосы, имеющей сходство с мерной рейкой. Когда комплекс анализируемой молекулы и меченого антитела достигает зоны иммобилизованных антител на хроматографической среде, происходит связывание, при этом связанные меченые антитела локализуются около этой зоны. Этот факт указывает на присутствие в образце анализируемой молекулы. Данную технику можно использовать для получения количественных и полуквантитативных результатов.

Примеры сэндвич иммуноанализов, выполненных на тест-полосках, описаны [2,3].

При конкурентных иммуноанализах метка обычно представляет собой меченый аналит или его аналог, который конкурирует за связывание антитела с любым немеченым аналитом, присутствующим в образце. Конкурентные иммуноанализы обычно

используют для обнаружения таких аналитов, как гаптены, так как каждый гаптен моновалентен и способен к связыванию только с одной молекулой антитела. Примеры устройств для конкурентного иммуноанализа продемонстрированы в [4,5,6].

Доступные в настоящее время хроматографические техники, использующие тест-полоски, хотя и являются полезными, но имеют и ряд недостатков. Многие образцы, как например фекалийные, содержат специфический материал, который может засорять поры хроматографической среды, сильно препятствуя хроматографическому процессу. Другие образцы, такие как кровь, содержат клетки и окрашенные компоненты, что делает затруднительным толкование результатов исследования. Даже если образец не создает помехи, то в существующих хроматографических анализирующих устройствах часто бывает трудно таким образом нанести образец на хроматографическую среду, чтобы фронт образца однородно перемещался через нее, соответственно обеспечивая единообразное достижение образцом области, где происходит связывание.

Другие проблемы, встречающиеся при работе с имеющимися в настоящее время тест-полосками, обусловлены природой исследуемых образцов и анализа, который необходимо выполнить. Для таких устройств осуществление промывочных шагов, которые часто бывают желательны для увеличения чувствительности и уменьшения фона, являются невыполнимыми. Также трудно и, во многих случаях, невозможно осуществить прединкубационные этапы внутри этого устройства.

Вдобавок существует необходимость в таком устройстве для иммунохроматографического анализа, с помощью которого можно выполнять широкий диапазон разделений, как например выделение жира из молока или разделение органических веществ, таких как бензол и толуол.

С приготовлением образцов и образованием отходов связаны и другие проблемы в имеющихся на текущий момент устройствах и техниках для иммунохроматографии. Увеличивающаяся распространенность заболеваний, передающихся посредством зараженной крови и ее фракций, таких как СПИД или гепатит, обострила эти проблемы. Часто бывает невозможно нанести образец (как например экскременты) или устройство для отбора проб (такое, как тампон для взятия мазка) прямо на хроматографическую среду. Обычно необходимо выполнить несколько экстракций и предварительных обработок образца перед тем, как можно будет нанести его на хроматографическую среду. Обыкновенно, врач или лаборант, проводящие испытания, выполняют эти процедуры в небольших сосудах, таких как тест-пробирки или микроцентрифужные пробирки, требующих использования отдельных приспособлений для переноса материала, таких как пипетки. В процессе использования каждое из этих устройств загрязняется и должно быть ликвидировано с особыми предосторожностями, чтобы персонал или другие люди, которые могут

неумышленно войти в контакт с отходами, не заразились.

Другим лимитирующим фактором использования врачом-консультантом или лаборантом существующих на текущий момент хроматографических устройств является еще и невозможность осуществить с их помощью двунаправленную или двумерную хроматографию. Давно известно, что эти методики представляют собой мощные аналитические инструменты, но их сложность в сравнении с простой однонаправленной хроматографией сделала трудновыполнимым их применение в устройствах с тест-полосками для использования во врачебном кабинете или клинической лаборатории.

Таким образом, существует необходимость в усовершенствованном аналитическом устройстве, предназначенном для выполнения широкого диапазона хроматографических анализов. Подобное устройство должно подходить для выполнения всех типов иммуноанализов, включая как сэндвич, так и конкурентный иммуноанализы, а также и для других типов анализов, использующих хроматографию. Такое устройство должно быть способно напрямую анализировать даже потенциально загрязненный образец или устройство для приготовления образца, чтобы исключить необходимость в использовании оборудования для экстракции и приспособлений для переноса материала. Подобное устройство, предпочтительно в виде тест-полоски, должно быть в состоянии выполнить без помех иммунохроматографические анализы окрашенных образцов или образцов, содержащих частицы, и должно обеспечить однородное и равномерное перенесение образца в хроматографическую среду, чтобы повысить чистоту и точность испытаний. В дополнении, конструкция такой усовершенствованной тест-полоски должна обеспечить осуществление двунаправленной или двумерной хроматографии при ее использовании в клинических лабораториях или врачебных кабинетах.

Авторами данного изобретения было разработано аналитическое устройство, которое удовлетворяет этим требованиям и обеспечивает улучшенное выполнение анализов биологически важных аналитов при простоте выполнения анализа и избегании загрязнения. Устройство может осуществлять все типы иммуноанализов, включая сэндвич иммуноанализы, конкурентные иммуноанализы и анализы, использующие комбинацию этих принципов. Устройство может выполнять серологические анализы, когда антиген, который необходимо обнаружить, сам является антителом, таким как антитело к *H. pylori*. Устройство может провести анализы, когда необходимый антиген обнаруживается не напрямую, а с помощью меченого второго антитела, связывающегося с первым антителом к этому аналиту.

Согласно настоящему изобретению для передачи жидкости от одного элемента устройства к другому, которые могут устанавливаться друг против друга (в дальнейшем называемые противоблоками), а также для перемещения жидкости через

хроматографическую среду в аналитическом устройстве используется давление. Оно не только ускоряет работу устройства, но и делает возможным выполнение дополнительных шагов, таких как экстракция для удаления мешающих специфических компонентов в пределах одного устройства. Давление образуется посредством скрепления противоблоков вместе с помощью сцепок - соединительных деталей, расположенных на каждом из противоблоков. Чтобы получить в результате оптимальное выполнение каждого шага процедуры анализа, предпочтительно приложить предварительно определенное значение давления.

Дополнительно устройство может выполнять другие типы анализов, основанных на специфическом связывании, как например: (1) анализы, основанные на аффинности специфически связывающихся белков, таких как пектины, рецепторы гормонов или вирусные рецепторы, к их специфическим лигандам; (2) анализы, основанные на аффинности ферментов к их соответствующим субстратам или ингибиторам; или (3) анализы, основанные на аффинности сегмента нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) к комплементарному сегменту нуклеиновой кислоты согласно схеме парности оснований Уотсона-Крика.

Устройство включает в себя:

(1) по меньшей мере, два строго плоских противоблока, один из которых содержит на своей поверхности хроматографическую среду; и

(2) средство для установки противоблоков друг против друга и приложения туда давления, достаточного для переноса жидкости с одного противоблока на другой в направлении строго перпендикулярном к противоблоку с целью нанесения образца на хроматографическую среду для обнаружения и/или определения вслед за тем аналита.

Согласно настоящему изобретению устройства могут также включать:

(1) по меньшей мере три строго плоских противоблока, отличающихся тем, что один из них содержит на своей поверхности хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(2) средство для установки противоблоков друг против друга, по меньшей мере, в двух различных комбинациях и приложения туда давления, достаточного для переноса жидкости с одного противоблока к другому в направлении строго перпендикулярном к противоблокам так, что образец прикладывается к хроматографической среде и перетекает через нее от первого конца ко второму концу для обнаружения и/или определения аналита на хроматографической среде; и

(3) по меньшей мере один аппликатор и один абсорбер, локализованные на одном из противоблоков и расположенные таким образом, что когда противоблок с аппликатором и абсорбером на нем устанавливается напротив противоблока, содержащего хроматографическую среду, на последнюю наносится вторая жидкость, которая перетекает через нее от второго конца к первому, вследствие чего направление движения потока через хроматографическую среду изменяется на

обратное, с целью обнаружения и/или определения аналита, осуществляемого после реверса потока через хроматографическую среду.

В одной реализации устройство для хроматографического анализа согласно настоящему изобретению включает в себя:

(1) первый противоблок, содержащий зону приготовления образца, приспособленную для получения исследуемого образца; и

(2) второй противоблок, содержащий хроматографическую среду.

Конструктивное воплощение устройства для хроматографического анализа, пригодного для проведения сэндвич иммуноанализов, включает в себя:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(б) детекторную аппликаторную подложку в действующем контакте с первым концом хроматографической среды;

(в) проводник в действующем контакте с детекторной аппликаторной подложкой и в непрямом контакте с первым концом хроматографической среды; и

(г) абсорбер в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды; и

(2) второй противоблок, содержащий зону приготовления образца для получения исследуемого образца.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга зона приготовления образца приходит в контакт с проводником с целью перенесения на него исследуемого образца и затем через детекторную аппликаторную подложку на первый конец хроматографической среды.

Обычно в зоне приготовления образца содержится, по меньшей мере, один реагент для обработки образца. В некоторых случаях, как например при анализе образцов мочи или плазмы, экстракция или другая обработка образца не требуются. Также обычно детекторная аппликаторная подложка содержит первого специфически связывающегося с аналитом партнера в перерастворимой посредством добавления к ней водной фазы форме, при этом первый специфически связывающийся партнер метится с помощью детектируемой метки, а хроматографическая среда, кроме того, содержит зону обнаружения значительно меньшую по площади, чем площадь хроматографической среды. При таком расположении зона обнаружения включает специфически связывающегося с аналитом партнера в иммобилизованной на ней форме, в результате чего в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий первого специфически связывающегося партнера, аналит и второго специфически связывающегося партнера, если аналит присутствует в образце.

Детектируемая метка предпочтительно является визуально детектируемой меткой.

Первый и второй противоблоки предпочтительно соединяются по типу дверной петли. Обычно такая структура является непроницаемой для водного раствора. Предпочтительно также наличие в противоблоках установленных по периметру стенок, которые зацепляются торец в торец, если устройство закрывают и замыкают.

Набор для анализа может включать в себя, в отдельных контейнерах, устройство для хроматографического анализа, описанное выше, и специфически связывающегося с аналитом партнера, меченого детектируемой меткой, которого необходимо нанести на детекторную аппликаторную подложку. С другой стороны, если детекторная аппликаторная подложка содержит способного к перерастворению меченого первого специфически связывающегося партнера, то в состав набора могут входить анализирующее устройство и водный раствор для перерастворения меченого специфически связывающегося партнера. Подобные наборы могут быть созданы и для других воплощений аналитических устройств в соответствии с настоящим изобретением.

Способ обнаружения и/или определения аналита в образце, использующий это аналитическое устройство в режиме сэндвич иммуноанализа, может включать в себя следующие этапы:

(1) нанесение водного образца на аппликаторную подложку для образца устройства для хроматографического анализа, содержащего на детекторной аппликаторной подложке способного к перерастворению меченого специфически связывающегося партнера;

(2) установление первого и второго противоблоков устройства для хроматографического анализа друг против друга, посредством чего водная фаза, содержащаяся в образце, перерастворяет меченого специфически связывающегося партнера в детекторной аппликаторной подложке, а образец и перерастворенный меченый специфически связывающийся партнер оказываются приложенными к проводнику;

(3) предоставление образцу и меченому специфически связывающемуся партнеру возможности двигаться через проводник и затем по меньшей мере через часть хроматографической среды, посредством чего меченый специфически связывающийся партнер указывает на присутствие аналита и/или позволяет количественно измерить аналит в исследуемом образце; и

(4) наблюдение и/или измерение меченого специфически связывающегося партнера по меньшей мере в части хроматографической среды для обнаружения и/или определения аналита.

В другом варианте такой конструкции второй противоблок может также содержать вторую детекторную аппликаторную подложку, находящуюся в действующем контакте с зоной приготовления образца. В этом варианте вторая детекторная аппликаторная подложка содержит второго меченого специфически связывающегося с аналитом партнера в форме, которая может быть перерастворена посредством добавления образца в зону приготовления образца; при этом второй меченый специфически связывающийся партнер метится детектируемой меткой и располагается таким образом, что нанесение образца в зону приготовления образца перерастворяет второго меченого специфически связывающегося партнера, вследствие чего зона приготовления образца содержит смесь образца и второго меченого

специфически связывающегося партнера. Первый и второй меченые, специфически связывающиеся партнеры предпочтительно идентичны и помечены одинаковыми метками.

Другой вариант конструктивного воплощения устройства для анализа в соответствии с настоящим изобретением содержит:

(1) первый противоблок, включающий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы; и

(б) проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды; и

(2) второй противоблок, включающий:

(а) зону приготовления образца для приема исследуемого образца; и

(б) абсорбер, отделенный от зоны приготовления образца.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга зона приготовления образца приходит в действующий контакт с проводником с целью перенесения исследуемого образца на проводник и затем на первый конец хроматографической среды, а абсорбер приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды для отбора оттуда жидкости. Перенесение абсорбера на второй противоблок делает возможным использование большего по размерам абсорбера, что может быть полезно, если желательно проанализировать образец относительно большого объема.

Другой вариант аналитического устройства с абсорбером на втором противоблоке в соответствии с настоящим изобретением имеет зону приготовления образца на первом противоблоке, хроматографическую среду и проводник в действующем контакте с зоной приготовления образца и первым концом хроматографической среды так, что проводник соединяет зону приготовления образца и хроматографическую среду. На втором противоблоке имеется аппликатор, содержащий специфически связывающегося партнера аналита в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к аппликатору, и отделенный от аппликатора абсорбер. Специфически связывающегося партнера, содержащегося в аппликаторе, метят с помощью детектируемой метки. В результате установки первого и второго противоблоков этого устройства друг против друга аппликатор приходит в действующий контакт с зоной приготовления образца таким образом, что добавление образца в зону приготовления образца перерастворяет меченого специфически связывающегося с аналитом партнера, а абсорбер приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды с целью отбора от нее жидкости.

Еще в одном варианте устройства для анализа с абсорбером на втором противоблоке в соответствии с настоящим изобретением первый противоблок включает хроматографическую среду и проводник. Второй противоблок содержит первый и второй аппликаторы и абсорбер. Абсорбер отделен как от первого, так и от второго аппликатора. Первый и второй аппликаторы на втором противоблоке не приводятся в

действующий контакт до тех пор, пока первый и второй противоблоки не устанавливаются друг против друга.

Абсорбер расположен таким образом, что в случае установления первого и второго противоблоков друг против друга он будет находиться в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды. Первый и второй противоблоки сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга проводник приходит в действующий контакт с первым и вторым аппликаторами, в связи с этим первый и второй аппликаторы приходят в действующий контакт друг с другом.

Второй аппликатор этого устройства может содержать детекторную аппликаторную подложку, включающую меченого первого специфически связывающегося партнера в форме, способной к перерастворению.

Способ применения этого устройства согласно настоящему изобретению включает следующие этапы: нанесение образца на первый аппликатор и установка первого и второго противоблоков друг против друга, в результате чего образец перерастворяет меченого специфически связывающегося партнера, находящегося в детекторной аппликаторной подложке. Хроматография и этапы обнаружения такие же, как описаны выше.

Еще один вариант аналитического устройства с абсорбером на втором противоблоке в соответствии с настоящим изобретением включает в себя:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(б) проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды; и

(в) детекторную аппликаторную подложку в прямом контакте с проводником и в непрямом с первым концом хроматографической среды; и

(2) второй противоблок, содержащий:

(а) аппликаторную подложку для образца; и

(б) абсорбер, отделенный от аппликаторной подложки для образца.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга:

(1) образец с аппликаторной подложки для образца переносится на детекторную аппликаторную подложку и, таким образом, через проводник на первый конец хроматографической среды; и

(2) абсорбер приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды.

Метод обнаружения для этого варианта аналитического устройства подобен описанным выше.

Еще один вариант аналитического устройства с абсорбером на втором противоблоке в соответствии с настоящим изобретением включает в себя:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы; и

(б) детекторную аппликаторную подложку в прямом контакте с первым концом хроматографической среды; и

(2) второй противоблок, содержащий:

(а) аппликаторную подложку для образца; и

(б) абсорбер, отделенный от аппликаторной подложки для образца.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга детекторная аппликаторная подложка и аппликаторная подложка для образца должны придти в контакт за исключением области детекторной аппликаторной подложки, примыкающей напрямую к первому концу хроматографической среды. Установка первого и второго противоблоков этого устройства друг против друга приводит к:

(1) нанесению исследуемого образца на детекторную аппликаторную подложку и затем на первый конец хроматографической среды; и

(2) приведению абсорбера в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды.

Еще одно анализирующее устройство с абсорбером на втором противоблоке в соответствии с настоящим изобретением включает в себя:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы; и

(б) проводник, расположенный таким образом, что не находится в действующем контакте с первым концом хроматографической среды до тех пор, пока первый и второй противоблоки не будут установлены друг против друга; и

(2) второй противоблок, содержащий:

(а) первый аппликатор;

(б) второй аппликатор; и

(в) абсорбер, отделенный от первого и второго аппликаторов, расположенных на втором противоблоке таким образом, что не находятся в действующем контакте до тех пор, пока первый и второй противоблоки не будут установлены напротив друг друга.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга:

(1) проводник приходит в действующий контакт с первым аппликатором, проводник также приходит в действующий контакт со вторым аппликатором, а второй аппликатор приходит в действующий контакт с первым концом хроматографической среды, тем самым располагая первый и второй аппликаторы в действующем контакте друг с другом для перенесения содержимого первого и второго аппликаторов на хроматографическую среду; и

(2) абсорбер приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды.

Другое конструктивное воплощение аналитического прибора, приспособленного для выполнения сэндвич иммуноанализа, в соответствии с настоящим изобретением допускает промывание хроматографической среды порцией образца для удаления несвязанного меченого специфически связывающегося партнера и уменьшения фона. Этот вариант конструкции содержит:

(1) первый противоблок, включающий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(б) проводник в действующем контакте с



первым концом хроматографической среды; и

(в) абсорбер в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды; и

(2) второй противоблок, включающий аппликатор, разделенный на два сектора:

(а) первый сектор, содержащий первого специфически связывающегося с аналитом партнера, меченного детектируемой меткой, в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к аппликатору; и

(б) второй сектор без меченого специфически связывающегося партнера.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга первый сектор, но не второй сектор, аппликатора размещается в прямом контакте с проводником, второй сектор при этом находится в непрямом контакте с проводником, для нанесения содержимого первого сектора аппликатора на хроматографическую среду. После нанесения содержимого первого сектора аппликатора на хроматографическую среду на нее переносится содержимое второго сектора аппликатора с целью обеспечения промывки.

Другое конструктивное воплощение настоящего изобретения касается аналитических устройств, приспособленных для выполнения конкурентного иммуноанализа с использованием меченого аналога аналита. Один вариант этой конструкции включает:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованного на ней в дискретной области, значительно меньшей по площади хроматографической среды, аналита или его иммунологического аналога;

(б) первый проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды; и

(в) второй проводник в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды;

(2) второй противоблок, содержащий первый аппликатор, включающий первого специфически связывающегося партнера аналита в форме, которая может быть перерастворена добавлением первой водной фазы к первому аппликатору; и

(3) третий противоблок, содержащий:

(а) второй аппликатор, включающий второго меченого специфически связывающегося партнера аналита в форме, которая может быть перерастворена добавлением второй водной фазы ко второму аппликатору, второго специфически связывающегося партнера при этом метят детектируемой меткой; и

(б) абсорбер, отделенный от второго аппликатора.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга первый проводник находится в действующем контакте с первым аппликатором, посредством чего содержимое первого аппликатора наносится на хроматографическую среду и далее переносится через по меньшей мере часть хроматографической среды. Первый и третий противоблоки сконструированы таким образом, что в результате установки их друг

против друга абсорбер находится в действующем контакте с первым проводником для удаления жидкости из хроматографической среды. Установка первого и третьего противоблоков друг против друга заставляет второй аппликатор приходить в действующий контакт со вторым проводником, за счет чего содержимое второго аппликатора наносится на хроматографическую среду и далее переносится по меньшей мере через ее часть, перекрывающую ту часть, через которую переносится содержимое первого аппликатора.

В этом устройстве первый специфически связывающийся партнер и второй, меченый, специфически связывающийся партнер, предпочтительно каждый являются антителом к аналиту. Предпочтительно, когда иммобилизованный аналит или его аналог представляет собой аналит, ковалентно связанный с белком, лишенным специфической связывающей активности к аналиту.

Способ применения этого аналитического устройства для определения аналита посредством конкурентного иммуноанализа включает следующие стадии:

(1) нанесение образца, содержащего первую водную фазу, на первый аппликатор устройства для хроматографического анализа;

(2) нанесение восстанавливающей жидкости, представляющей собой вторую водную фазу, на второй аппликатор;

(3) установка первого и второго противоблоков устройства для хроматографического анализа друг против друга так, что образец и перерастворенный первый специфически связывающийся партнер аналита переносится на первый проводник и затем на первый конец хроматографической среды;

(4) предоставление образцу и перерастворенному первому специфически связывающемуся партнеру возможности двигаться по меньшей мере через часть хроматографической среды, блокируя сайты связывания на иммунологическом аналоге, иммобилизованном в дискретной области;

(5) разъединение первого и второго противоблоков;

(6) установка первого и третьего противоблоков друг против друга, посредством чего перерастворенный меченый второй специфически связывающийся партнер переносится на второй проводник и затем на второй конец хроматографической среды;

(7) предоставление перерастворенному меченому второму специфически связывающемуся партнеру возможности двигаться через по меньшей мере часть хроматографической среды, перекрывающей всю область хроматографической среды, через которую перед этим были перенесены образец и перерастворенный первый специфически связывающийся партнер, в результате чего при наличии аналита в исследуемом образце меченый второй специфически связывающийся партнер связывается с аналитом или его иммунологическим аналогом, иммобилизованным в дискретной области, благодаря связыванию образца и аналита с



первым специфически связывающимся партнером; и

(8) наблюдение и/или измерение второго специфически связывающегося партнера в дискретной области для обнаружения и/или определения аналита.

Предпочтительно, когда этот способ дополнительно включает этап инкубирования устройства для хроматографического анализа после нанесения образца на первый аппликатор для ускорения реакции между аналитом и первым специфически связывающимся партнером.

В альтернативном способе применения этого устройства в дополнение к образцу на первый аппликатор может быть добавлена первая восстанавливающая фаза.

Другие варианты аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, приспособленного для выполнения конкурентных иммуноанализов, могут быть использованы подобным же образом.

Следующий вариант аналитического устройства для проведения конкурентного иммуноанализа в соответствии с настоящим изобретением включает:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованных на ней в дискретных неперекрывающихся областях, каждая из которых значительно меньше хроматографической среды:

(i) специфически связывающегося партнера аналита; и

(ii) вторичного специфически связывающегося партнера, способного к связыванию с элементом специфически связывающейся пары, который утратил аффинность к аналиту, и локализованного ближе к первому концу, чем первый специфически связывающийся партнер;

(б) первый проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды; и

(в) второй проводник в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды;

(2) второй противоблок, содержащий:

(а) аппликатор, содержащий аналог аналита, представляющий собой аналит, ковалентно связанный с элементом специфически связывающейся пары, утратившим аффинность к аналиту, и способный к связыванию вторичным специфически связывающимся партнером, при этом элемент специфически связывающейся пары метится детектируемой меткой, а аналог аналита находится в форме, способной к перерастворению посредством добавления водной фазы к аппликатору; и

(б) абсорбер, отделенный от аппликатора.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга второй проводник находится в действующем контакте с аппликатором, посредством чего содержимое аппликатора прикладывается к хроматографической среде и переносится по меньшей мере через часть ее, а абсорбер находится в действующем контакте с первым проводником для отвода жидкости с хроматографической среды.

Кроме того, этот вариант устройства предпочтительно включает крышку,

прикрепленную шарнирно к первому противоблоку, позволяющую обжимать первый и второй противоблоки, когда они установлены друг против друга. В крышке имеется отверстие, вырезанное для того, чтобы иметь возможность осматривать по меньшей мере часть хроматографической среды, в том случае, когда установленные друг против друга противоблоки обжимаются крышкой.

В этом варианте предпочтительно, если первый специфически связывающийся партнер представляет собой специфичное к аналиту антитело, а вторичный специфически связывающийся партнер - второе антитело, обладающее способностью связывать иммуноглобулин, лишенный специфичности к аналиту. Предпочтительно, когда аналог аналита представляет собой аналит, ковалентно связанный с иммуноглобулином какого-либо вида, а специфически связывающийся партнер является антителом, специфичным к этому виду.

Кроме того, этот вариант может включать третий противоблок, который содержит абсорбер, расположенный таким образом, что приводится в контакт со всей хроматографической средой и обоими проводниками после установки первого и третьего противоблоков друг против друга. В этом случае отверстие располагается позади хроматографической среды, что дает возможность обозреть по меньшей мере часть хроматографической среды с оборотной стороны, когда второй противоблок накладывается на первый противоблок, а третий на второй.

В другом варианте область вторичного специфически связывающегося партнера, иммобилизованного на хроматографической среде, разделена по меньшей мере на две отдельные и неперекрывающиеся полосы, каждая из которых содержит определенное количество вторичного специфически связывающегося партнера; таким образом, количество аналога аналита, связанного в зоне обнаружения, и, следовательно, концентрация аналита в исследуемом образце указывается числом полос, с которыми связывается аналог аналита.

Еще один вариант аналитического устройства, приспособленного для выполнения конкурентного анализа, в соответствии с настоящим изобретением использует биотин-авидиновую связь. Этот вариант устройства включает:

(1) первый противоблок, содержащий хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованных на ней в изолированных дискретных неперекрывающихся областях, каждая из которых значительно меньше размера хроматографической среды:

(а) вещество, способное к специфичному связыванию с биотином, выбранное из группы, включающей авидин, стрептавидин, антибиотинное антитело и их производные; и

(б) вторичного специфически связывающегося партнера, способного специфически связываться с трехкомпонентным комплексом, содержащим:

(i) аналит;

(ii) элемент специфически связывающейся пары, лишенной специфически связывающейся аффинности к аналиту;

элемент при этом связывается с аналитом ковалентной связью; и

(iii) детектируемую метку, связанную с элементом специфически связывающейся пары;

(2) второй противоблок, содержащий первый аппликатор, включающий первого специфически связывающегося с аналитом партнера в форме, которую можно перерастворить добавлением водного образца к первому аппликатору, при этом первый специфически связывающийся партнер ковалентно соединен с биотином и не способен к связыванию вторичным специфически связывающимся партнером;

(3) третий противоблок, содержащий:

(а) второй аппликатор, включающий трехкомпонентный комплекс в форме, которая может быть перерастворена добавлением второй водной фазы ко второму аппликатору; и

(б) абсорбер, отделенный от второго аппликатора.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга первый проводник находится в действующем контакте с первым аппликатором, посредством чего содержимое первого аппликатора накладывается на хроматографическую среду и переносится по меньшей мере через ее часть. Первый и третий противоблоки сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга абсорбер располагается в контакте с первым проводником для отвода жидкости с хроматографической среды, а второй аппликатор приходит в действующий контакт со вторым проводником, посредством чего содержимое второго аппликатора накладывается на хроматографическую среду и переносится по меньшей мере через ее часть, перекрывающую ту часть хроматографической среды, через которую переносилось содержимое первого аппликатора.

Предпочтительно, когда первый специфически связывающийся партнер представляет собой анти-аналит антитело. Элементом специфически связывающейся пары трехкомпонентного комплекса может являться иммуноглобулин G кролика, в этом случае вторичным специфически связывающимся партнером может быть козий анти-(IgG кролика). Предпочтительно, чтобы веществом, способным специфически связывать биотин, являлся стрептавидин.

Область иммобилизации вторичного специфически связывающегося партнера на хроматографической среде может быть разделена по меньшей мере на две отдельные и не перекрывающиеся полосы, каждая из которых содержит определенное количество вторичного специфически связывающегося партнера, таким образом количество трехкомпонентного комплекса, связанного в зоне обнаружения, и, следовательно, исходная концентрация аналита в исследуемом образце определяются числом полос, с которыми связывается трехкомпонентный комплекс.

Еще одна версия устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением, приспособленного для выполнения

конкурентного анализа, включает:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованных на ней в изолированных и неперекрывающихся дискретных областях, каждая из которых значительно меньше хроматографической среды:

(i) аналог аналита, способный связывать специфически связывающегося партнера к аналиту; и

(ii) вторичного специфически связывающегося партнера, способного связывать элемент специфически связывающейся пары, который обладает аффинностью к аналиту, при этом сам вторичный специфически связывающийся партнер лишен аффинности к аналиту; и

(б) проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды; и

(2) второй противоблок, содержащий аппликатор, включающий специфически связывающегося с аналитом партнера в перерастворимой добавлении к аппликатору водной фазы форме.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга проводник размещается в действующем контакте с аппликатором, посредством чего содержимое аппликатора накладывается на хроматографическую среду и переносится по меньшей мере через ее часть.

Предпочтительно, когда первым специфически связывающимся партнером является специфичное к аналиту антитело, а аналог аналита представляет собой аналит, ковалентно соединенный с белком, не обладающим активностью специфически связываться с аналитом или со специфически связывающимся партнером к указанному аналиту. Предпочтительно, когда вторичный специфически связывающийся партнер связывает специфичное к аналиту антитело на основе видоспецифических взаимодействий, не вовлекающих антигенсвязывающий сайт антитела к аналиту.

В этом устройстве область иммобилизации вторичного специфически связывающегося партнера на хроматографической среде может быть разделена по меньшей мере на две дискретные и неперекрывающиеся полосы, каждая из которых содержит определенное количество вторичного специфически связывающегося партнера, и таким образом количество меченого специфически связывающегося с аналитом партнера, связанного в зоне обнаружения, и, следовательно, количество аналита в исследуемом образце определяются числом полос, с которыми связывается меченый специфически связывающийся партнер.

Другая версия аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, приспособленного для выполнения конкурентного иммуноанализа, представляет собой трехкомпонентное устройство, включающее два этапа миграции реагентов через хроматографическую среду, оба проходящие в одном и том же направлении. Это устройство включает в себя:

(1) первый противоблок, содержащий:

(а) хроматографическую среду, имеющую

первый и второй концы и иммобилизованных на ней в изолированных дискретных и не перекрывающихся областях, каждая из которых меньше хроматографической среды:

(i) специфически связывающегося с аналитом партнера; и

(ii) второго специфически связывающегося с аналитом партнера, как описано выше, расположенного ближе к первому концу хроматографической среды;

(б) первый проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды и способный функционировать как первый аппликатор; и

(в) второй проводник в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды;

(2) второй противоблок, содержащий:

(а) второй аппликатор, включающий аналог аналита, как описано выше, и присутствующий в перерастворимой добавлении к аппликатору водной фазы форме; и

(б) первый абсорбер, отделенный от второго аппликатора; и

(3) третий противоблок, содержащий второй абсорбер.

Первый и второй противоблоки этого устройства сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга второй аппликатор приходит в действующий контакт с первым проводником, а первый абсорбер - в действующий контакт со вторым проводником. Первый и третий противоблоки сконструированы таким образом, что в результате установки их друг против друга второй абсорбер располагается в прямом контакте с первым проводником и хроматографической средой для удаления из нее жидкости.

Эти и другие особенности, аспекты и преимущества настоящего изобретения станут более понятны при рассмотрении следующих описания, формулы и сопровождающих рисунков, где:

Фиг. 1А представляет собой рисунок одного варианта двублочного устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением;

Фиг. 1Б представляет собой рисунок изображенного на фиг. 1А двублочного устройства для хроматографического анализа, показанного с установленными друг против друга двумя блоками;

Фиг. 2 представляет собой рисунок варианта двублочного устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением, в котором первый противоблок включает зону приготовления образца и хроматографическую среду, не связанную с зоной приготовления образца, а второй противоблок включает проводящий соединительный элемент;

Фиг. 3 представляет собой рисунок другой версии двублочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением с зоной приготовления образца, введенной в первый противоблок;

Фиг. 4 представляет собой рисунок альтернативного варианта версии, изображенной на фиг. 3, с абсорбером предпочтительнее на втором противоблоке, нежели на первом;

Фиг. 5 представляет собой рисунок другого варианта двублочного аналитического

устройства в соответствии с настоящим изобретением с зоной приготовления образца и абсорбером, расположенными на одном и том же противоблоке;

Фиг. 6 представляет собой рисунок еще одного варианта двублочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением с двумя детекторными аппликаторными подложками на разных противоблоках;

Фиг. 7 представляет собой рисунок еще одной версии двублочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, включающего два аппликатора на одном из блоков;

Фиг. 8 представляет собой рисунок альтернативного варианта версии, изображенной на фиг. 7, с абсорбером предпочтительно на втором противоблоке, нежели на первом;

Фиг. 9 представляет собой рисунок еще одного варианта двублочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением с разрывом между проводником и хроматографической средой, который соединяется, когда устройство закрыто;

Фиг. 10А представляет собой рисунок еще одного варианта двублочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, содержащего детекторную аппликаторную подложку в действующем контакте с хроматографической средой;

Фиг. 10Б представляет собой вид сзади изображенного на фиг. 10А двублочного аналитического устройства, данного в разрезе и демонстрирующей детали блоков, установленных друг против друга;

Фиг. 11А представляет собой рисунок еще одного варианта двублочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, в основном подобного варианту, изображенному на фиг. 10, но с детекторной аппликаторной подложкой в прямом контакте с хроматографической средой;

Фиг. 11Б представляет собой вид сзади изображенного на фиг. 11А двублочного аналитического устройства, данного в разрезе и демонстрирующей детали блоков, установленных друг против друга;

Фиг. 12А представляет собой рисунок варианта двублочного аналитического устройства согласно настоящему изобретению, пригодного для выполнения двунаправленной хроматографии;

Фиг. 12Б представляет собой вид сверху изображенного на фиг. 12А двублочного устройства для хроматографического анализа, показанного с установленными друг против друга двумя блоками;

Фиг. 13А представляет собой рисунок другого варианта двублочного аналитического устройства, пригодного для выполнения двунаправленной хроматографии, с двумя аппликаторами и проводником;

Фиг. 13Б представляет собой вид сверху изображенного на фиг. 13А двублочного устройства для хроматографического анализа, показанного с установленными друг против друга двумя блоками;

Фиг. 14 представляет собой рисунок другого двублочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением с детекторной аппликаторной

подложкой на первом противоблоке и с зоной приготовления образца;

Фиг. 15 представляет собой рисунок другого двублочного аналитического устройства согласно настоящему изобретению с аппликатором, разделенным на два сектора, обеспечивающим промывку хроматографической среды образцом, свободным от метки;

Фиг. 16А представляет собой рисунок еще одного двублочного аналитического устройства, пригодного для двунаправленной хроматографии, с крышкой;

Фиг. 16Б представляет собой вид сверху изображенного на фиг. 16А двублочного устройства для хроматографического анализа, показанного с установленными друг против друга двумя блоками;

Фиг. 17А представляет собой рисунок трехблочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением;

Фиг. 17Б представляет собой вид сзади изображенного на фиг. 17А трехблочного аналитического устройства, данного в разрезе и демонстрирующего детали блоков, установленных друг против друга;

Фиг. 18 представляет собой рисунок трехблочного аналитического устройства согласно настоящему изобретению, в котором третий блок действует как поглотитель жидкости со всей хроматографической среды и обоих проводников;

Фиг. 19 представляет собой рисунок множественного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, пригодного для одновременного анализа одного или более образцов;

Фиг. 20 представляет собой рисунок варианта множественного аналитического устройства согласно настоящему изобретению, содержащего складное углубление для помещения образца;

Фиг. 21 представляет собой рисунок другого варианта множественного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, адаптированного для получения тестовой карты;

Фиг. 22 представляет собой рисунок еще одного варианта множественного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, адаптированного для получения тестовой карты;

Фиг. 23 представляет собой рисунок варианта трехблочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, пригодного для выполнения конкурентного иммуноанализа, использующего меченое антитело, связывающееся с иммобилизованным на хроматографической среде аналогом аналита;

Фиг. 24 представляет собой рисунок двублочного аналитического устройства с крышкой, пригодного для выполнения конкурентного иммуноанализа с использованием меченого аналога аналита;

Фиг. 25 представляет собой рисунок трехблочного аналитического устройства, пригодного для выполнения однонаправленного конкурентного анализа с использованием меченого аналога аналита, третий блок которого действует как поглотитель жидкости со всей хроматографической среды и с обоих проводников;

Фиг. 26 представляет собой рисунок трехблочного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, пригодного для выполнения конкурентного иммуноанализа и использующего биотин-авидиновое взаимодействие;

Фиг. 27 представляет собой рисунок двублочного аналитического устройства, пригодного для выполнения конкурентного анализа с использованием меченого анти-аналит антитела; и

Фиг. 28 представляет собой изображение аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением, пригодного для приема тампона или похожего устройства для нанесения образца и сконструированного для обнаружения антигена *Streptococcus A*.

#### Определения

В контексте данного описания следующие термины определяются как указано ниже, за исключением случаев, отмеченных особо. Специфически связывающийся партнер: одна из пары молекул, которые взаимодействуют посредством специфических нековалентных взаимодействий, зависящих от их трехмерных структур. Типичными парами специфически связывающихся партнеров являются антиген - антитело, гаптен - антитело, гормон - рецептор, нить нуклеиновой кислоты - комплементарная нить нуклеиновой кислоты, субстрат - фермент, ингибитор - фермент, углевод - пектин, биотин - авидин и вирус - рецептор.

Действующий контакт: два твердых компонента находятся в действующем контакте, когда они соединяются напрямую или опосредованно таким образом, что водная фаза может течь от одного из двух компонентов к другому существенно непрерывно под действием капиллярных сил или другим способом. "Прямой контакт" означает, что два элемента находятся в физическом контакте боковыми или фронтальными гранями. В типичном случае, когда два компонента находятся в прямом контакте, они заходят один на другой с перекрытием приблизительно от 0,5 до 3 мм. Вместе с тем, компоненты могут быть расположены, просто соприкасаясь соседними гранями. "Непрямой контакт" означает, что два элемента не находятся в физическом контакте, но соединены с помощью одного или более проводников.

Ограниченная емкость: абсорбер имеет ограниченную емкость, если насыщается жидкостью, полученной во время обычного проведения анализа в устройстве, в котором он расположен. В таком состоянии абсорбер может выделять дополнительно абсорбированную жидкость и становиться по меньшей мере частично проводящим.

Аналит: термин "аналит" включает как саму измеряемую молекулу, так и ее аналоги и производные, когда такие аналоги и производные связывают другую молекулу, используемую в анализе, по существу так же, как связывает ее аналит.

Антитело: термин "антитело" включает как интактные молекулы антител соответствующей специфичности, так и их фрагменты (включающие Fab, F(ab') и F(ab')<sub>2</sub> фрагменты), а также химически модифицированные интактные молекулы антител и их фрагменты, включая гибридные антитела, созданные за счет реассоциации

субъединиц in vitro.

Вторичный специфически связывающийся партнер: дополнительный специфически связывающийся партнер, который связывается с элементами пары специфически связывающихся партнеров во время их взаимодействия, называется вторичным специфически связывающимся партнером. Например, пару специфически связывающихся партнеров могут составлять Giardia а антиген и антитело на Giardia из кролика. В таком случае вторичным специфически связывающимся партнером может служить антитело из козы против кроличьего иммуноглобулина G. Вторичный специфически связывающийся партнер может быть специфичен к виду, классу или подклассу антитела, с которым он связывается. В альтернативном случае, когда один из специфически связывающихся партнеров помечен биотином, вторичный специфически связывающийся партнер может представлять собой молекулу, конъюгированную с авидином.

План описания

Для удобства читателя и с целью помочь пониманию организации описания, приводится следующий план описания, данный в терминах названий разделов.

#### 1. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

##### A. Двублочные устройства

###### 1. Общее строение

###### 2. Отдельные варианты конструкции двублочного устройства

а. Устройство с проводящим соединительным элементом на втором блоке

б. Устройство с зоной приготовления образца на первом противоблоке

в. Устройство с абсорбером на втором блоке

г. Устройство с зоной приготовления образца и абсорбером на одном и том же противоблоке

д. Устройство с двумя детекторными аппликаторными подложками на различных противоблоках

е. Устройство, включающее два отдельных аппликатора на одном и том же противоблоке

ж. Устройство с двумя аппликаторами и абсорбером на втором противоблоке

з. Устройство с зазором или разрывом между проводником и хроматографической средой

и. Устройство с подложкой для меченого специфически связывающегося партнера на одном противоблоке с хроматографической средой

к. Устройство с детекторной аппликаторной подложкой в прямом контакте с первым концом хроматографической среды

л. Двухнаправленное устройство, включающее второй аппликатор и абсорбер на втором противоблоке

м. Двухнаправленное устройство, включающее два аппликатора и проводник

н. Устройство с детекторной аппликаторной подложкой на первом блоке

о. Устройство с двухсекторным аппликатором для обеспечения промывки

Б. Двублочное устройство с крышкой

В. Трехблочное устройство

Г. Множественные устройства

1. Основное множественное устройство

2. Множественное устройство со складным углублением

3. Множественные устройства, адаптированные для введения тестовой карты

#### II. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КОНКУРЕНТНЫХ АНАЛИЗОВ

A. Трехблочное устройство с двухнаправленным потоком

Б. Двублочное устройство с двухнаправленным потоком, имеющее крышку

В. Трехблочное устройство с однонаправленным потоком, снабженное абсорбером

Г. Трехблочное устройство с двухнаправленным потоком, использующее специфичность биотина

Д. Двублочное устройство для конкурентного ингибиторного иммуноанализа

#### III. АНАЛИТЫ И АНТИТЕЛА, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В АНАЛИТИЧЕСКИХ УСТРОЙСТВАХ

##### IV. НАБОРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

##### 1. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Один из аспектов настоящего изобретения включает в себя устройства для хроматографического анализа, особенно полезные для анализа аналитов в биологических образцах. Эти устройства подходят для прямого нанесения биологических образцов без предварительных этапов экстракции и сконструированы таким образом, чтобы минимизировать воздействие на результаты измерений, вызываемое наличием частиц или окрашенных образцов.

Устройство имеет по меньшей мере два существенно плоских противоблока. Один из таких блоков имеет хроматографическую среду на своей поверхности.

Устройство предназначено для установки противоблоков друг против друга и прикладывания к ним давления. Прикладываемое давление существенно для переноса жидкости от одного противоблока к другому в направлении, строго перпендикулярном к противоблокам, посредством чего образец оказывается нанесенным на хроматографическую среду для обнаружения и/или определения в нем аналита. Давление также способствует продвижению жидкости через хроматографическую среду, что ускоряет процесс хроматографии, позволяя получить результаты за более короткий промежуток времени. Дополнительно давление делает возможным проведение непосредственно в устройстве таких этапов, как этапы экстракции, и может быть использовано для удаления избытка жидкости из хроматографической среды абсорберами с целью уменьшения фона измерений. Давление возникает за счет расположения противоблоков друг напротив друга и поддержания их в скрепленном состоянии с помощью сцепок, таких как замки и зажимы.

В соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы устройства для проведения как сэндвич, так и конкурентного анализов.

В том случае, когда устройство сконструировано для проведения сэндвич

иммуноанализа, обычно по меньшей мере в один из противоблоков устройства включается первый, меченый, специфически связывающийся партнер анализита. Этот первый, меченый, специфически связывающийся партнер анализита находится в форме, способной к перерастворению в водной фазе. Водной фазой, используемой для перерастворения, может служить образец. Первый, меченый, специфически связывающийся партнер располагается таким образом, чтобы он мог реагировать с анализитом в образце.

В устройстве, пригодном для проведения сэндвич иммуноанализа, хроматографическая среда включает в себя зону обнаружения второго, немеченого, иммобилизованного на ней специфически связывающегося партнера анализита. Зона обнаружения по размерам существенно меньше хроматографической среды. Эти компоненты организованы таким образом, что в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий: (1) первого, меченого, специфически связывающегося партнера; (2) анализит; и (3) второго, немеченого, специфически связывающегося партнера в том случае, когда в образце присутствует анализит.

В устройстве, пригодном для проведения конкурентного иммуноанализа, хроматографическая среда имеет включенного в нее (по меньшей мере в одну зону, существенно меньшую по размерам хроматографической среды) элемента специфически связывающейся пары, состоящей из анализита или его аналога и специфически связывающегося партнера анализита. В соответствии с настоящим изобретением возможно несколько различных конструкций устройства для проведения конкурентного иммуноанализа. Эти различные варианты строения описаны ниже.

Обычно обнаружение и/или определение анализита после нанесения образца на хроматографическую среду происходит с помощью визуально детектируемого меченого компонента. Предпочтительно, когда меченый компонент представляет собой либо анализит или его аналог, либо специфически связывающийся партнер анализита, пришитые к визуально детектируемой метке.

Устройства для анализа в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы для одновременного проведения более чем одного анализа. В таких устройствах один из существенно плоских блоков имеет в своем составе по меньшей мере две раздельные и не контактирующие хроматографические среды.

Один из вариантов устройства особенно удобен для проведения двунаправленной хроматографии, хотя и не ограничивается этим способом использования. Такое устройство включает в себя по меньшей мере три существенно плоских противоблока. Один из них содержит на своей поверхности хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы. Указанное трехблочное устройство выполнено с возможностью размещения пар противоблоков друг против друга по меньшей мере в двух различных комбинациях и прикладывания туда давления путем прижатия противоположных блоков друг к другу за счет сцепок, таких как замки и

зажимы. Давление оказывается достаточным для переноса жидкости от одного противоблока к другому в направлении, строго перпендикулярном противоблокам, и движения жидкости через хроматографическую среду. За счет этого образец наносится на хроматографическую среду и протекает через нее от первого конца до второго.

Устройство также включает в себя по меньшей мере один аппликатор и один абсорбер, помещенные на одном из противоблоков и расположенные так, что когда противоблок, содержащий аппликатор и абсорбер, устанавливается напротив противоблока, содержащего хроматографическую среду, к последней прикладывается вторая жидкость. Указанная жидкость протекает через хроматографическую среду от второго конца к первому. Это меняет направление потока через хроматографическую среду на противоположное. Обнаружение и/или определение анализита производят после изменения направления потока.

А. Двублочные устройства

Одним из вариантов конструкции представляемого настоящим изобретением аналитического устройства является двублочное устройство для хроматографического анализа, действующее в одном измерении с однонаправленным потоком.

1. Общее строение двублочного устройства

В общем случае двублочное устройство для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением содержит:

(1) первый противоблок, включающий зону приготовления образца, приспособленную для приема анализируемого образца; и

(2) второй противоблок, включающий хроматографическую среду.

Когда устройство закрыто, первый и второй его противоблоки могут устанавливаться друг против друга, способствуя нанесению анализируемого образца на хроматографическую среду посредством прикладывания к ней зоны приготовления образца. В процессе использования первый и второй противоблоки обычно устанавливаются друг против друга после того, как детектирующий реагент помещается в зону приготовления образца. Когда первый и второй противоблоки устанавливаются друг против друга, прикладывание зоны приготовления образца переносит образец и детектирующий реагент на хроматографическую среду. После этого образцу и детектирующему реагенту предоставляется возможность пересечь по меньшей мере часть хроматографической среды, так что детектирующий реагент дает обнаруживаемую индикацию присутствия и/или количества анализита; при этом детектирующий реагент наблюдается и/или измеряется по меньшей мере в части хроматографической среды. Результатом этого является обнаружение и/или определение анализита.

Описание деталей конструкции этого основного устройства также применимо, насколько это возможно, к остальным двублочным и трехблочным аналитическим



устройствам в соответствии с настоящим изобретением.

Детектирующий реагент представляет собой первого специфически связывающегося партнера анализата, как описано выше; он может включать дополнительные компоненты.

Этот процесс может давать качественную и/или количественную индикацию анализата в зависимости от плотности второго специфически связывающегося партнера в зоне обнаружения и размеров зоны обнаружения.

Обычно для получения результатов требуется от 30 секунд до 10 минут, чаще от 1 до 5 минут, включающих некоторый период инкубации образца в зоне приготовления образца и время, необходимое для осуществления самой хроматографии. Обычно анализ проводят при комнатной температуре, однако он может быть выполнен при 4°C или, в некоторых случаях, при температурах до 37°C или выше в зависимости от природы анализата и его специфически связывающихся партнеров. В некоторых случаях проведение анализа при пониженной температуре может быть желательным для уменьшения деградации, в то время как в других случаях, при подходящих анализатах и специфически связывающихся партнерах, анализ может быть ускорен выполнением его при повышенной температуре.

Общее строение этого устройства для хроматографического анализа показано на фиг. 1А. Указанное устройство 10 имеет первый противоблок 11 и второй противоблок 12. Первый противоблок 11 включает зону приготовления образца 13. Второй противоблок 12 содержит хроматографическую среду 14. Хроматографическая среда 14 имеет первый конец 15 и второй конец 16; хроматографическая среда 14 содержит зону обнаружения 17 и контрольную зону 18. Первый противоблок 11 и второй противоблок 12 соединены с помощью петли 19. Первый и второй противоблоки 11 и 12 предпочтительно в дополнение содержат сцепки, которые закрепляют первый и второй противоблоки в положении друг против друга. Сцепки могут представлять собой замки, такие как замки 20 и 21, которые замкнуты, когда первый противоблок 11 и второй противоблок 12 установлены друг против друга. Конструкция и размеры замков 20 и 21 могут варьироваться для того, чтобы вызвать приложение оптимального давления на противоблоки 11 и 12. Оптимальная величина давления может зависеть от толщины и устройства хроматографической среды 14, необходимого объема образца и других факторов. Для защиты от утечки растворов образцов или реагентов по периметру первого и второго противоблоков 11 и 12 располагается скрепляющий выступ или прокладка 22. Несмотря на то, что использование сцепок, таких как замки 20 и 21, и скрепляющего выступа 22, в общем случае является предпочтительным, эти компоненты не являются необходимыми для создания базового устройства в соответствии с настоящим изобретением. Второй противоблок 12 имеет первое окно 23; дополнительно первый противоблок 11 может

иметь второе окно 24, что позволяет наблюдать хроматографическую среду 14 с обеих сторон. Второе окно 24 позволяет наблюдать за хроматографической средой 14 со стороны, противоположной поверхности, на которую наносятся реагенты. В другом варианте первое окно 23 может отсутствовать, а второе окно 24 использоваться для наблюдения за хроматографической средой 14. В целом, двублочные устройства в соответствии с настоящим изобретением могут иметь как одно, так и два окна, также называемых отверстиями, для того, чтобы иметь возможность наблюдать за хроматографической средой или через противоблок, не содержащий хроматографической среды, например, в окно 23 на фиг.1, или через противоблок, содержащий хроматографическую среду, например, в окно 24 на фиг. 1. В альтернативном варианте первый и/или второй противоблоки 11 и 12 могут быть изготовлены из прозрачного или просвечивающего материала так, что хроматографическая среда 14 может быть видна без отдельного отверстия или окна.

Фиг. 1Б изображает устройство 10 после установки противоблоков 11 и 12 друг против друга. Хроматографическая среда 14, включающая зону обнаружения 17 и контрольную зону 18, просматривается через окно 24. Зона приготовления образца 13 контактирует с хроматографической средой 14 по ее первому концу 15, или вблизи него так, что содержимое зоны приготовления образца 13 может протекать через хроматографическую среду 14, включающую зону обнаружения 17 и контрольную зону 18.

Устройство 10 может, кроме того, дополнительно включать проводник 25, находящийся в действующем контакте с первым концом 15 хроматографической среды 14, как показано на фиг. 1А. В качестве материала для проводника 25 может использоваться такой материал, как целлюлоза или другой материал, способный проводить водную фазу без заметной ее абсорбции. Проводник 25 может быть обработан поверхностно-активным веществом, так чтобы реагенты могли быть более равномерно нанесены на хроматографическую среду 14. В тех случаях, когда имеется проводник 25, зона приготовления образца 13 предпочтительно контактирует с проводником 25, когда первый и второй противоблоки 11 и 12 устанавливаются друг против друга.

Устройство 10 может дополнительно содержать абсорбер 26, находящийся в действующем контакте со вторым концом 16 хроматографической среды 14 для облегчения протекания жидкости через хроматографическую среду 14 от ее первого конца 15 ко второму концу 16, как показано на фиг. 1А.

Зона приготовления образца 13 может быть изготовлена из любого подходящего материала, такого как целлюлоза, бумага, нейлон, вискоза, стекловолокно, шерсть или материал, представляющий собой нетканую синтетическую структуру, но не ограничена этими материалами. Пористость материала для зоны приготовления образца 13 может подбираться в целях фильтрации клеточного



материала или частиц в таких образцах, как цельная кровь или фекалии. Зона приготовления образца 13 может содержать по меньшей мере один реагент для обработки образца перед его нанесением на хроматографическую среду 14.

Реагенты, которые могут присутствовать в зоне приготовления образца 13, изменяются в зависимости от образца, вносимого в зону приготовления образца 13, и от анализируемого аналита. Они могут включать в себя (но не ограничиваются этим) кислоты или щелочи для подведения pH, буферные растворы для поддержания pH, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА и ЭГТА для связывания металлов, гидролитические ферменты для лизирования клеточных мембран клеток животных или клеточных стенок бактерий с целью высвобождения аналитов, образующая азотистую кислоту. Нитрит натрия может присутствовать в сухом виде в зоне приготовления образца 13, а уксусная кислота может быть добавлена в зону приготовления образца 13 после добавления туда образца.

Образец или, возможно, устройство для отбора образца, такое как тампон для взятия мазка или микропористый фильтр, может быть помещен оператором в зону приготовления образца 13; при необходимости могут быть добавлены другие реагенты.

Остовы первого и второго противоблоков 11 и 12 предпочтительно изготавливаются из слоистого картона, который достаточно непроницаем для влаги и может удерживать жидкости, участвующие в проведении анализа. Могут быть использованы и другие материалы на основе целлюлозы, такие как бумажный картон или твердый отбеленный сульфит (ТОС). В других случаях остовы могут быть изготовлены из пластика, непроницаемого для влаги. Подходящим пластиком является поликарбонатный пластик, как например Лексан™.

Петля 19 предпочтительно изготавливается из материала, непроницаемого для водной фазы, такого как пластик, совместимый по свойствам или аналогичный материалу, идущему на изготовление остовов первого и второго противоблоков 11 и 12.

Обычно хроматографическая среда 14, абсорбер 26, проводник 25 и другие принимающие жидкость реагенты прикрепляются к остовам первого и второго противоблоков 11 и 12 с помощью связующего. Подходящие связующие хорошо известны специалистам в этой области. Могут быть использованы и другие методы скрепления, такие как соединение скобой или приклеивание.

Аналит обнаруживается как с помощью меченого специфически связывающегося партнера аналита, так и с использованием меченого вторичного специфически связывающегося партнера для специфически связывающегося партнера аналита. В большинстве случаев использование меченого специфически связывающегося партнера аналита является

предпочтительным. Метка в меченом специфически связывающемся партнере предпочтительно должна быть визуально детектируемой, такой как коллоидная металлическая метка. Предпочтительными коллоидными металлическими метками являются золото, серебро, бронза, железо или олово, наиболее предпочтительной является золото. Приготовление меченных золотом антител описано [7]. Антитела, меченные коллоидным золотом, коммерчески доступны, например, в химической компании Сигма, Шт. Луис, Миссури.

В качестве альтернативы могут быть использованы другие коллоидные метки, такие как коллоидная метка серы или окрашенная кремниевая метка. Менее предпочтительно использование в качестве визуально детектируемой метки окрашенного латекса. Возможно использование и других меток, таких как радиоактивные метки.

Хотя авторы не настаивают на последующей теории, все-таки следует отметить, что когда жидкая фаза, содержащая образец, оказывается приложенной к способному к перерастворению специфически связывающемся партнеру, меченому коллоидной металлической меткой, такой как коллоидное золото, кинетика реакции между аналитом и меченым специфически связывающимся партнером является чрезвычайно быстрой. Результатом этой быстрой кинетики является по существу полное мечение аналита до того, как комбинация аналита и меченого специфически связывающегося партнера оказывается приложенной к хроматографической среде. Таким образом, в однонаправленной хроматографической процедуре, проводимой с помощью аналитического устройства, выполненного согласно настоящему изобретению, хроматографии подвергается преимущественно двойной комплекс аналита и соответствующего меченого специфически связывающегося партнера. Это делает возможным отделение этого комплекса от загрязнений, не связывающих специфически связывающегося партнера, и улучшает точность анализа.

В этом варианте конструкции меченый специфически связывающийся партнер предпочтительно находится в зоне приготовления образца 13 в форме, перерастворимой с помощью добавления жидкости (водной фазы) в зону приготовления образца. Обычно такой жидкостью является сам образец. В некоторых случаях, в особенности, когда используются небольшие объемы пробы, бывает желательным добавлять дополнительный буферный раствор или другую водную фазу в зону приготовления образца.

В других вариантах конструкции, описанных ниже, меченый специфически связывающийся партнер может находиться в части устройства для хроматографического анализа, отличной от зоны приготовления образца, но приходит с ней в контакт во время проведения анализа. В этих вариантах конструкции меченый специфически связывающийся партнер находится в этой части устройства преимущественно в форме, способной к перерастворению, и перерастворяется, когда образец приходит в

контакт с этой частью устройства. В некоторых случаях меченый специфически связывающийся партнер может быть перерастворен за счет добавления к этой части устройства отдельной водной фазы, отличной от образца.

Хроматографическая среда 14 на втором противоблоке 12 представляет собой плоскую полосу. Обычно она бывает прямоугольной формы и имеет первый и второй концы 15 и 16. По всему тексту Описания термин "первый конец" 15 приписывается тому концу хроматографической среды 14, к которому прикладывается образец, а термин "второй конец" 16 - противоположному концу. Поток образца в норме направлен от первого конца 15 хроматографической среды 14 ко второму концу 16. Хроматографическая среда 14 состоит из материала, подходящего в качестве среды для тонкослойной хроматографии анализов и конъюгатов анализов с антителами, такого как нитроцеллюлоза, нейлон, вискоза, целлюлоза, бумага или кремнезем. Хроматографическая среда 14 в случае необходимости может быть предварительно обработана или модифицирована. Обычно хроматографическая среда 14 является просвечивающей, так что окрашенные зоны, проявляющиеся на ней как результат анализа, могут наблюдаться с обеих сторон.

В некоторых случаях применения имеет смысл накладывать вторую гибкую прозрачную подложку на верхнюю поверхность хроматографической среды 14 с тем, чтобы регулировать поток образца через хроматографическую среду 14 и предотвращать миграцию поверх хроматографической среды. Подходящими гибкими, прозрачными подложками являются полиэтилен, винил, Милар и целлофан.

Когда устройство для хроматографического анализа 10 предназначено для использования в таком виде анализа, как сэндвич иммуноанализ, хроматографическая среда может дополнительно включать зону обнаружения 17 существенно меньших размеров, чем хроматографическая среда 14. Эта зона обнаружения может содержать иммобилизованного в ней для предотвращения диффузии второго специфически связывающегося партнера анализа. Второй специфически связывающийся партнер может быть связан с хроматографической средой как ковалентным, так и нековалентным способами. Если анализируемый анализ представляет собой антиген или гаптен, то вторым специфически связывающимся партнером может быть антитело на антиген или на гаптен. И наоборот, анализом может быть антитело, а вторым специфически связывающимся партнером может являться гаптен или антиген, способный к специфическому связыванию антителом.

Хроматографическая среда 14 может, кроме того, включать в себя контрольную зону 18 значительно меньшую, чем хроматографическая среда 14, и отделенную от зоны обнаружения 17. Контрольная зона 18 может содержать не способного к диффузии анализа, иммобилизованного а ней с целью связывания меченого антитела, которое не связывается в зоне обнаружения 17

посредством образования тройного "сэндвич" комплекса. Каждое такое антитело связывается иммобилизованным анализом и образует детектируемую зону или полосу. Это обеспечивает контроль за проведением анализа и правильностью связывания реагентов, как описано ниже. Методы, используемые для связывания второго специфически связывающегося партнера в зоне обнаружения 17 и анализа в контрольной зоне 18 хорошо известны специалистам в этой области и не нуждаются в дальнейшем описании.

В альтернативном случае для некоторых анализов, таких как углеводы, может быть трудно или невозможно прочно зафиксировать анализ в хроматографической среде 14. В таких случаях контрольная зона 18 может включать в себя зону иммобилизованного антитела, специфичного к меченому анти-аналит антителу. Например, если анализом является углевод, специфичный для *Streptococcus A*, а меченым антителом является IgG кролика, специфичный к этому антигену *Streptococcus A*, то контрольная зона 18 может содержать антитела козы к IgG кролика. В этих случаях для предотвращения полного захвата меченого анти-аналит антитела в зоне обнаружения 17 при высокой концентрации анализа и последующем исчезновении меченого анти-аналит антитела из контрольной зоны 18, бывает желательным добавить меченое антитело, неспецифичное к анализу и принадлежащее другому виду, нежели меченое антианалит антитело. Такое антитело может составлять иммунологически нейтральный иммуноглобулин или антитело к анализу, не обнаруживаемому в исследуемом образце. Контрольная зона 18 будет в таком случае содержать антивидовое антитело или анализ, не обнаруживаемый в тестируемом образце.

Возможны несколько вариантов такого устройства. В одном варианте, как обсуждалось выше, зона приготовления образца 13 может, кроме того, содержать специфически связывающегося партнера анализа, меченного детектируемой меткой, в форме, способной к перерастворению посредством добавления жидкой фазы в зону приготовления образца 13. Водной фазой может являться сам образец. Меченый специфически связывающийся партнер может быть лиофилизирован или обратимо осажден таким образом, чтобы он стал перерастворенным и подвижным, благодаря добавлению образца в зону приготовления образца. В этом варианте нет необходимости добавлять детектирующий реагент в зону приготовления образца 13, так как он автоматически образуется посредством добавления образца в зону приготовления образца 13.

В другом варианте проводник 25 в действующем контакте с первым концом 15 хроматографической среды 14 на втором противоблоке может быть заменен на абсорбер 25а с ограниченной емкостью, находящийся в действующем контакте. Абсорбер 25а располагается таким образом, что приходит в контакт с зоной приготовления образца 13 в том случае, когда первый 11 и второй 12 противоблоки установлены друг против друга, для нанесения образца на

абсорбер. Это может быть полезным для контролирования поступления образца в хроматографическую среду 14 с тем, чтобы хроматографическая среда 14 не оказалась перегруженной.

В этом варианте абсорбер 25a может содержать меченого специфически связывающегося партнера анализита в форме, способной к перерастворению, как описано выше. При таком расположении меченый специфически связывающийся партнер перерастворяется, когда первый и второй противоблоки 11 и 12 устанавливаются друг против друга, обеспечивая нанесение образца на абсорбер 25a. Комбинация образца и перерастворенного меченого специфически связывающегося партнера затем поступает на первый конец 15 хроматографической среды 14.

2. Отдельные варианты конструкции двублочного устройства

а. Устройство с проводящим соединительным элементом во втором блоке  
В одном из вариантов конструкции двублочного устройства в соответствии с настоящим изобретением, первый противоблок включает:

- (1) зону приготовления образца; и
- (2) хроматографическую среду, изначально не сообщающуюся с зоной приготовления образца.

Второй противоблок включает проводящий соединительный элемент. Первый и второй противоблоки могут быть расположены друг против друга с тем, чтобы посредством соединительного элемента установить сообщение между зоной приготовления образца и хроматографической средой, результатом которого будет нанесение образца на хроматографическую среду.

Этот вариант конструкции изображен на фиг. 2. Устройство для хроматографического анализа 40 включает первый противоблок 41 и второй противоблок 42. Первый противоблок содержит зону приготовления образца 43 и хроматографическую среду 44, имеющую первый конец 50 и второй конец 51. В хроматографической среде 44 имеется зона обнаружения 45 и контрольная зона 46. Второй противоблок 42 содержит в себе проводящий соединительный элемент 47. Первый и второй противоблоки 41 и 42 соединены с помощью петли 48. Первый и второй противоблоки 41 и 42 также содержат сцепки, такие как замки 52 и 53, с прокладкой 54, окружающей первый и второй противоблоки 41 и 42. Второй противоблок 42 имеет отверстие 49, позволяющее наблюдать за хроматографической средой 44.

Когда первый и второй противоблоки 41 и 42 установлены друг против друга, зона приготовления образца 43 первого противоблока 41 приводится в контакт с проводящим соединительным элементом 47 второго противоблока 42, который, в свою очередь, приводится в контакт с первым концом 50 хроматографической среды 44 для нанесения образца на хроматографическую среду 44.

В вариантах устройства, изображенного на фиг.2, проводящий соединительный элемент 47 может содержать меченого детектируемой меткой специфически связывающегося партнера анализита, присутствующего в форме,

способной к перерастворению посредством добавления жидкой фазы. В этом варианте образец добавляется в зону приготовления образца 43. И наоборот, зона приготовления образца 43 может быть использована для добавления меченого специфически связывающегося партнера анализита в жидкой форме, с самим образцом, добавленным к соединительному проводящему элементу 47. Еще в одном альтернативном варианте зона приготовления образца 43 может содержать способного к перерастворению специфически связывающегося партнера анализита, с образцом, опять же добавленным к проводящему соединительному элементу 47.

б. Устройство с зоной приготовления образца на первом противоблоке

Другой вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой устройство, в котором зона приготовления образца размещена на первом противоблоке, т.е. блоке, на котором расположена хроматографическая среда. Обычно, в этом варианте конструкции второй противоблок содержит аппликатор, включающий меченого специфически связывающегося партнера в форме, которая может быть перерастворена.

В этом варианте конструкции установка первого и второго противоблоков друг против друга приводит аппликатор в контакт с зоной приготовления образца, посредством чего перерастворяется меченый специфически связывающийся партнер анализита.

Предпочтительно, когда первый противоблок кроме того содержит проводник, а действующий контакт между зоной приготовления образца и хроматографической средой достигается за счет удержания и зоны приготовления образца и хроматографической среды в контакте с проводником.

Предпочтительно, когда первый противоблок содержит еще и абсорбер в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды.

Хроматографическая среда преимущественно составляется как было описано ранее, с зоной обнаружения и контрольной зоной.

Этот вариант конструкции аналитического устройства показан на Фиг.3. Устройство для хроматографического анализа 60 имеет первый противоблок 61 и второй противоблок 62. Первый противоблок 61 включает в себя зону приготовления образца 63, проводник 64 в действующем контакте с зоной приготовления образца 63, хроматографическую среду 65, имеющую первый конец 66 и второй конец 67, и абсорбер 68, находящийся в действующем контакте со вторым концом 67 хроматографической среды 65. Хроматографическая среда 65 содержит зону обнаружения 69 и контрольную зону 70. Второй противоблок 62 содержит аппликатор 71, предпочтительно включающий в себя меченого специфически связывающегося партнера в форме, способной к перерастворению. Первый противоблок 61 и второй противоблок 62 соединены с помощью петли 72. Второй противоблок 62 содержит окно 73, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды

65. Первый и второй противоблоки 61 и 62 имеют сцепки, такие как замки 74 и 75. и прокладку 76, окружающую первый и второй противоблоки 61 и 62.

В процессе использования образец наносится в зону приготовления образца 63. Вслед за этим первый и второй противоблоки 61 и 62 устанавливаются друг против друга таким образом, что образец, находящийся в зоне приготовления образца 63, перерабатывает содержимое аппликатора 71, включающее меченого специфически связывающегося партнера. После этого содержимое зоны приготовления образца 63 и аппликатора 71 наносится на хроматографическую среду 65, проходя через зону приготовления образца 63 и проводник 64.

в. Устройство с абсорбером на втором блоке

В альтернативном варианте этой конструкции, абсорбер может быть помещен вместо первого противоблока на второй противоблок. В этом варианте абсорбер приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга. Это позволяет применять абсорбер больших размеров, который может быть желательным при необходимости использования образцов большего объема в случае обнаружения аналита, находящегося только в низких концентрациях.

Такой вариант конструкции показан на фиг.4. Устройство для хроматографического анализа 80 состоит из первого противоблока 81 и второго противоблока 82. Первый противоблок 81 включает в себя зону приготовления образца 83, проводник 84 в действующем контакте с зоной приготовления образца 83 и хроматографическую среду 85, имеющую первый конец 86 и второй конец 87, с зоной обнаружения 88 и контрольной зоной 89. Второй противоблок 82 содержит аппликатор 90 и абсорбер 91; на втором противоблоке 82 аппликатор 90 отделен от абсорбера 91. Первый противоблок 81 и второй противоблок 82 соединены с помощью петли 92. Второй противоблок 82 также содержит отверстие 93, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды 85. Первый и второй противоблоки 81 и 82 кроме этого включают сцепки, такие как замки 94 и 95, и прокладку 96, описано выше.

В процессе использования образец наносится в зону приготовления образца 83, в которой может осуществляться экстракция или другая его обработка. Затем образец поступает на первый конец 86 хроматографической среды 85 посредством протекания через проводник 84, как описано выше. Когда первый противоблок 81 и второй противоблок 82 установлены друг против друга, апп- ликатор 90 приходит в действующий контакт с проводником 84 для перерастворения меченого специфически связывающегося партнера в аппликаторе 90 и нанесения перерастворенного меченого специфически связывающегося партнера на проводник 84 и далее на первый конец 86 хроматографической среды 85, что позволяет перерастворенному специфически связывающемуся партнеру достичь хроматографической среды 85.

Одновременно абсорбер 91 приходит в действующий контакт со вторым концом 87 хроматографической среды 85 для отбора жидкости из хроматографической среды 85.

г. Устройство с зоной приготовления образца и абсорбером на одном и том же противоблоке

Другой вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой двублочное устройство, в котором зона приготовления образца и абсорбер расположены на одном и том же противоблоке. В некоторых случаях это дает преимущество, позволяя использовать абсорбер больших размеров для более быстрого и эффективного отвода жидкости от второго конца хроматографической среды.

Этот вариант конструкции двублочного устройства для хроматографического анализа показан на фиг. 5. Хроматографическое устройство 100 имеет первый противоблок 101 и второй противоблок 102, соединенные с помощью петли 103. Первый противоблок 101 включает хроматографическую среду 104, имеющую первый конец 105 и второй конец 106, и проводник 107 в действующем контакте с первым концом 105 хроматографической среды 104. Хроматографическая среда 105 содержит зону обнаружения 108 и, возможно, контрольную зону 109.

Второй противоблок 102 включает зону приготовления образца 110 для приема анализируемого образца и абсорбер 111, отделенный от зоны приготовления образца 110. Зона приготовления образца 110 может содержать меченого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению. Во втором противоблоке 102 имеется отверстие 112 для наблюдения за хроматографической средой. Первый и второй противоблоки 101 и 102 имеют сцепки, такие как замки 113 и 114, и прокладку 115, как описано выше.

Когда первый 101 и второй 102 противоблоки установлены друг против друга, зона приготовления образца 110 приходит в действующий контакт с проводником 107 для нанесения образца на проводник 107 и затем на первый конец 105 хроматографической среды 104. Абсорбер 111 приходит в действующий контакт со вторым концом 106 хроматографической среды 104 для отбора жидкости от второго конца 106 хроматографической среды 104. По другим пунктам дизайн и принцип действия этого устройства аналогичны таковым в устройстве, показанном выше на фиг.4.

д. Устройство с двумя детекторными аппликаторными подложками на различных противоблоках

Еще один вариант конструкции двублочного устройства для анализа в соответствии с настоящим изобретением включает две детекторные аппликаторные подложки, расположенные на различных противоблоках. Эта конструкция особенно удобна в тех случаях, когда требуется использовать большой объем меченого специфически связывающегося партнера, либо когда меченое антитело доступно только в разбавленной форме и попытки его сконцентрировать будут приводить к его денатурации или инактивации.

Этот вариант конструкции двублочного

устройства для хроматографического анализа изображен на Фиг.6. Устройство для хроматографического анализа 120 имеет первый противоблок 121 и второй противоблок 122, соединенные с помощью петли 123. Первый противоблок 121 включает хроматографическую среду 124, имеющую первый конец 125 и второй конец 126. Хроматографическая среда 124 включает зону обнаружения 127 и, возможно, контрольную зону 128.

В первом противоблоке 121 также имеется первая детекторная аппликаторная подложка 129 в действующем контакте с первым концом 125 хроматографической среды 124. Первая детекторная аппликаторная подложка содержит первого специфически связывающегося партнера аналита в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы в первую детекторную аппликаторную подложку 129. Первый специфически связывающийся партнер обычно помечен детектируемой меткой. На первом противоблоке 121 также имеется проводник 130 в действующем контакте с первой детекторной аппликаторной подложкой 129, посредством чего первая детекторная аппликаторная подложка 129 соединяет проводник 130 и первый конец 125 хроматографической среды 124. На первом противоблоке 121 также имеется абсорбер 131 в действующем контакте со вторым концом 126 хроматографической среды 124.

Второй противоблок 122 включает зону приготовления образца, предназначенную для приема анализируемого образца. Второй противоблок 122 также содержит вторую детекторную аппликаторную подложку 133 в действующем контакте с зоной приготовления образца 132, расположенной поверх второй детекторной аппликаторной подложки 133. Зона приготовления образца 132 и вторая детекторная аппликаторная подложка 133 могут удерживаться вместе с помощью зажима или связующего. Вторая детекторная аппликаторная подложка 133 и зона приготовления образца 132 располагаются таким образом, что образец, внесенный в зону приготовления образца 132, должен пройти через зону приготовления образца 132 прежде, чем он достигнет второй детекторной аппликаторной подложки 133. Вторая детекторная аппликаторная подложка 133 содержит второго специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению за счет добавления образца в зону, приготовления образца 132. Вторая детекторная аппликаторная подложка 133 располагается таким образом, что внесение образца в зону приготовления образца 132 приводит к перерастворению второго специфически связывающегося партнера, в результате чего зона приготовления образца 132 содержит смесь образца и второго специфически связывающегося партнера.

Второй специфически связывающийся партнер помечен детектируемой меткой. Предпочтительно, чтобы первый и второй специфически связывающиеся партнеры были идентичными, а детектируемые метки, с помощью которых они метятся, были одинаковы.

Во втором противоблоке 122 также содержится отверстие 134, обеспечивающее

наблюдение по меньшей мере за частью хроматографической среды 124, включающей зону обнаружения 127 и контрольную зону 128, если она имеется. В первом и втором противоблоках 121 и 122 также имеются сцепки, такие как замки 135 и 136, и прокладка 137, как было описано выше для базового двублочного устройства.

Когда первый и второй 121 и 122 противоблоки установлены друг против друга, зона приготовления образца 132 приходит в контакт с проводником 130 для нанесения образца и второго специфически связывающегося партнера на проводник 130 и затем на первый конец 125 хроматографической среды 124 через первую детекторную аппликаторную подложку 129. Таким образом, образец последовательно контактирует сначала со вторым специфически связывающимся партнером, а затем с первым специфически связывающимся партнером перед тем, как попасть на первый конец 125 хроматографической среды 124 для хроматографии. В результате этого больший объем меченого специфически связывающегося партнера оказывается в контакте с образцом, что увеличивает чувствительность анализа.

е. Устройство, включающее два раздельных аппликатора на одном и том же противоблоке

Еще один вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой конструкцию, включающую два раздельных аппликатора на одном и том же противоблоке. Эти два аппликатора не находятся в действующем контакте до тех пор, пока не соединяются проводником противоположного блока в результате установки блоков друг против друга.

Этот вариант конструкции устройства для хроматографического анализа изображен на Фиг.7. В устройстве для хроматографического анализа 140 имеется первый противоблок 141 и второй противоблок 142. Первый противоблок 141 включает хроматографическую среду 143, имеющую первый конец 144 и второй конец 145, проводник 146 в действующем контакте с первым концом 144 и абсорбер 147 в действующем контакте со вторым концом 145 хроматографической среды 143. Хроматографическая среда 143 содержит зону обнаружения 148 и контрольную зону 149. Второй противоблок 142 содержит первый аппликатор (аппликаторная подложка для образца) 150 и второй аппликатор (детекторная аппликаторная подложка) 151. Первый аппликатор 150 и второй аппликатор 151 не находятся в действующем контакте до тех пор, пока первый противоблок 141 и второй противоблок 142 не установлены друг против друга. Когда первый противоблок 141 и второй противоблок 142 установлены друг против друга, первый аппликатор 150 приходит в контакт с проводником 146, а второй аппликатор 151 приходит в контакт как с проводником 146, так и с первым концом 144 хроматографической среды 143. Перекрытие обычно составляет несколько миллиметров, то есть является достаточным для обеспечения переноса жидкости. В

результате этого первый аппликатор 150 и второй аппликатор 151 становятся связанными проводником 146, посредством чего содержимое первого аппликатора 150 и второго аппликатора 151 прикладывается к хроматографической среде 143. Первый противоблок 141 и второй противоблок 142 соединяются с помощью петли 152. Второй противоблок 142 содержит окно 153, позволяющее наблюдать за хроматографической средой 143. В состав первого и второго противоблоков 141 и 142 также входят сцепки, такие как замки 154 и 155, и прокладка 156.

Первый аппликатор 150 может включать аппликаторную подложку для образца, а второй аппликатор 151 может включать детекторную аппликаторную подложку, в которую может быть внесен детектирующий реагент. Когда первый и второй противоблоки 141 и 142 устанавливаются друг против друга, содержимое аппликаторной подложки для образца и детекторной аппликаторной подложки переносится через проводник 146 к хроматографической среде 143.

Второй аппликатор 151 (детекторная аппликаторная подложка) преимущественно содержит меченого детектируемой меткой специфически связывающегося партнера анализа в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы во второй аппликатор 151. Водной фазой обычно является сам образец, который перерастворяет меченого специфически связывающегося партнера, когда первый 141 и второй 142 противоблоки устанавливаются друг против друга. В некоторых видах анализов может быть желательным добавление отдельной перераспределяющей водной фазы в детекторную аппликаторную подложку. В альтернативном варианте меченый специфически связывающийся партнер может быть нанесен в жидкой форме на вторую аппликаторную подложку 151.

ж. Устройство с двумя аппликаторами и абсорбером на втором противоблоке

В другом варианте конструкции данного устройства абсорбер может быть перенесен с первого противоблока (т.е., противоблока, содержащего хроматографическую среду) на второй противоблок (т.е., противоблок с первым и вторым аппликатором). Это позволяет использовать образец большего объема и может быть желательным при обнаружении анализов, присутствующих в низких концентрациях.

Этот вариант представлен на фиг. 8. В устройстве для хроматографического анализа 160 имеется первый противоблок 162 и второй противоблок 164. В состав первого противоблока 162 входит хроматографическая среда 166, имеющая первый конец 168 и второй конец 170, а также проводник 172 в действующем контакте с первым концом 168 хроматографической среды 166. Хроматографическая среда 166 содержит зону обнаружения 174 и контрольную зону 176. Второй противоблок 164 содержит первый аппликатор (аппликаторную подложку для образца) 178 и второй аппликатор (детекторную аппликаторную подложку) 180. Первый аппликатор 178 и второй аппликатор 180 не находятся в действующем контакте, пока первый противоблок 162 и второй

противоблок 164 не установлены друг против друга, затем они скрепляются как описано ранее для устройства, изображенного на Фиг.7. В состав второго противоблока 164 также входит абсорбер 182, отделенный от первого аппликатора 178 и второго аппликатора 180. Когда первый противоблок 162 и второй противоблок 164 установлены друг против друга, первый аппликатор 178 и второй аппликатор 180 соединяются проводником 172, за счет чего содержимое первого аппликатора 178 и второго аппликатора 180 наносится на хроматографическую среду 166. Одновременно с этим абсорбер 182 приходит в действующий контакт со вторым концом 170 хроматографической среды 166 для удаления жидкости из хроматографической среды 166. Первый противоблок 162 и второй противоблок 164 соединены с помощью петли 184. Во втором противоблоке 164 имеется окно 186, позволяющее наблюдать хроматографическую среду 166. Первый и второй противоблоки также включают замки 185 и 187 и прокладку 188.

з. Устройство с зазором или разрывом между проводником и хроматографической средой

Дальнейшая модификация этого устройства включает зазор или разрыв между проводником и хроматографической средой, в результате чего путь потока жидкости, начинаясь от первого аппликатора, лежит через проводник, затем через второй аппликатор и, наконец, через хроматографическую среду.

Этот вариант конструкции устройства показан на фиг.9. В устройстве для хроматографического анализа 190 имеется первый противоблок 191 и второй противоблок 192. Первый противоблок 191 включает в себя хроматографическую среду 193, имеющую первый конец 194 и второй конец 195, проводник 196, не находящийся в действующем контакте с первым концом 194 хроматографической среды 193, когда устройство 190 открыто, и абсорбер 197 в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды 193. Хроматографическая среда 193 содержит зону обнаружения 198 и контрольную зону 199. Второй противоблок 192 содержит первый аппликатор (аппликаторную подложку для образца) 200 и второй аппликатор (детекторную аппликаторную подложку) 201. Первый аппликатор 200 и второй аппликатор 201 не находятся в состоянии действующего контакта, пока первый противоблок 191 и второй противоблок 192 не установлены друг против друга. Когда в результате защелкивания петли 203, соединяющей первый противоблок 191 и второй противоблок 192, первый противоблок 191 и второй противоблок 192 устанавливаются друг против друга, первый аппликатор 200 и второй аппликатор 201 соединяются проводником 196, а второй аппликатор 201 начинает контактировать с хроматографической средой 193. Таким образом, путь протекания жидкости проходит от первого аппликатора 200 через проводник 196, далее через второй аппликатор 201 и, наконец, на хроматографическую среду 193. Во втором противоблоке 192 имеется окно 202, позволяющее наблюдать за



хроматографической средой 193. Первый и второй противоблоки 191 и 192 также содержат сцепки, такие как замки 204 и 205, и прокладку 206, как описано выше.

и. Устройство с подложкой для меченого специфически связывающегося партнера на одном противоблоке с хроматографической средой

Еще один вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой двублочное устройство с подложкой для меченого специфически связывающегося партнера на одном противоблоке с хроматографической средой. В этом устройстве аппликатор для образца расположен на другом противоблоке.

Этот вариант устройства в соответствии с настоящим изобретением изображен на фиг.10А. В устройстве для хроматографического анализа 210 имеется первый противоблок 212 и второй противоблок 214. Первый противоблок 212 содержит хроматографическую среду 216, имеющую первый конец 218 и второй конец 220. В хроматографической среде имеется зона обнаружения 222 и, возможно, контрольная зона 224, как описано выше для других вариантов аналитических устройств, пригодных для выполнения сэндвич-иммуноанализа. Первый противоблок 212 также содержит проводник 226 в действующем контакте с первым концом 218 хроматографической среды 216 и абсорбер 228 в действующем контакте со вторым концом 220 хроматографической среды 216. В состав первого противоблока 212 входит также детекторная аппликаторная подложка 230 в прямом контакте с проводником 226 и в непрямом контакте с первым концом 218 хроматографической среды 216. Во втором противоблоке 214 имеется аппликаторная подложка для образца 232. Первый противоблок 212 и второй противоблок 214 соединены с помощью петли 234. Когда первый противоблок 212 и второй противоблок 214 установлены друг против друга, аппликаторная подложка для образца 232 приходит в контакт с детекторной аппликаторной подложкой 230. Второй противоблок 214 содержит окно 236, позволяющее наблюдать за хроматографической средой 216. Первый и второй противоблоки 212 и 214 содержат сцепки, такие как замки 233 и 235, и прокладку 237, как описано выше.

Вид сзади устройства 210, данный в разрезе, изображен на фиг.10Б. Первый противоблок 212 и второй противоблок 214 изображены на фиг.10Б в положении друг против друга. Аппликаторная подложка для образца 232 показана в контакте с детекторной аппликаторной подложкой 230. Детекторная аппликаторная подложка 230 контактирует с проводником 226, который в свою очередь соединен с первым концом 218 хроматографической среды 216. Показаны также зона обнаружения 222 и контрольная зона 224 хроматографической среды 216. Второй конец 220 хроматографической среды 216, расположенный ближе к контрольной зоне 224, находится в контакте с абсорбером 228.

Установка первого и второго противоблоков 212 и 214 друг против друга

обеспечивает нанесение тестируемого образца с аппликаторной подложки для образца 232 на детекторную аппликаторную подложку 230 и, следовательно, на первый конец 218 хроматографической среды 216 через проводник 226.

Детекторная аппликаторная подложка 230 преимущественно содержит первого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению за счет добавления к детекторной аппликаторной подложке 230 водной фазы, при этом первый специфически связывающийся партнер помечен детектируемой меткой.

Содержимое аппликаторной подложки для образца 232 после нанесения туда образца предпочтительно представляет собой водную фазу, а эта водная фаза, нанесенная на детекторную аппликаторную подложку 230, включает в себя содержимое аппликаторной подложки для образца. В такой конструкции не требуется никакой дополнительной жидкости для перерастворения меченого специфически связывающегося партнера.

В одном из вариантов этого устройства абсорбер вместо первого противоблока помещается на второй противоблок. Абсорбер отделен от аппликаторной подложки для образца, также расположенной на втором противоблоке, и приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды в том случае, когда первый противоблок и второй противоблок установлены друг против друга, как показано выше на Фиг.5.

к. Устройство с детекторной аппликаторной подложкой в прямом контакте с первым концом хроматографической среды

В следующем варианте конструкции этого устройства отсутствует проводник между детекторной аппликаторной подложкой и хроматографической средой, в результате чего детекторная аппликаторная подложка находится в прямом контакте с первым концом хроматографической среды. В этом случае, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга, детекторная аппликаторная подложка и аппликаторная подложка для образца находятся в контакте за исключением той части, которой детекторная аппликаторная подложка непосредственно примыкает к первому концу хроматографической среды. В этой части детекторной аппликаторной подложки имеется небольшой зазор или отвод, не позволяющий образцу перетекать напрямую из аппликаторной подложки для образца на хроматографическую среду. Этот зазор или отвод обычно составляет примерно от 0,5 мм до 2 мм, чаще всего приблизительно от 0,5 мм до 1 мм.

Этот вариант конструкции особенно удобен для обнаружения скрытой в фекалиях крови с помощью меченого антитела на гемоглобин и позволяет обнаружить концентрацию гемоглобина, соответствующую 17 мл крови на 100 г экскрементов (13 мг гемоглобина на грамм экскрементов), без ошибочных негативных результатов, обусловленных значительным "побочным" эффектом.

Этот вариант конструкции изображен на фиг. 11А. В устройстве для хроматографического анализа 250 имеется



первый противоблок 252 и второй противоблок 254. В состав первого противоблока 252 входит хроматографическая среда 256, имеющая первый конец 258 и второй конец 260. Хроматографическая среда 256 содержит зону обнаружения 262 и контрольную зону 264. В первом противоблоке 252 также имеется абсорбер 266 в действующем контакте со вторым концом 260 хроматографической среды 256. Первый противоблок 252 кроме этого включает детекторную аппликаторную подложку 268 в прямом контакте с первым концом 258 хроматографической среды 256. Во втором противоблоке 254 имеется аппликаторная подложка для образца 270. Первый противоблок 252 соединен со вторым противоблоком 254 посредством петли 272. Когда первый противоблок 252 и второй противоблок 254 установлены друг против друга, аппликаторная подложка для образца 270 приходит в контакт с детекторной аппликаторной подложкой 268 за исключением узкого зазора или отвода 274 в той части детекторной аппликаторной подложки 268, которая контактирует с первым концом 258 хроматографической среды 256. Этот зазор 274 предохраняет образец от непосредственного попадания с аппликаторной подложки для образца 270 на хроматографическую среду 256. Во втором противоблоке 254 имеется окно 276, позволяющее наблюдать за хроматографической средой 256. В состав первого и второго противоблоков 252 и 254 входят сцепки, такие как замки 278 и 280, и прокладка 282, как описано выше.

На фиг. 11Б изображен вид сзади устройства 250, показанного на фиг. 11А, данный в разрезе по линии 11А. На фиг. 11Б первый и второй противоблоки 252 и 254 изображены в положении друг против друга с замкнутой петлей 272. Аппликаторная подложка для образца 270 показана в контакте с детекторной аппликаторной подложкой 268, за исключением небольшого зазора 274 на ближайшем к хроматографической среде 256 конце детекторной аппликаторной подложки 268. Детекторная аппликаторная подложка 268 находится в прямом контакте с первым концом 258 хроматографической среды 256. Показаны также зона обнаружения 262 и контрольная зона 264 хроматографической среды 256. Второй конец 260 хроматографической среды 256, расположенный ближе к контрольной зоне 264, находится в контакте с абсорбером 266.

л. Двухнаправленное устройство, включающее второй аппликатор и абсорбер на втором противоблоке

Следующий вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением способен осуществлять двухнаправленную хроматографию.

Этот вариант конструкции устройства для хроматографического анализа приведен на фиг. 12А. В аналитическом устройстве 300 имеется первый противоблок 302 и второй противоблок 304. На первом противоблоке 302 расположена хроматографическая среда 306, имеющая первый конец 308 и второй конец 310. Первый противоблок 302 также

содержит первый аппликатор 312 в действующем контакте с первым концом 308 хроматографической среды 306. Хроматографическая среда 306 также включает зону обнаружения 314 и, возможно, контрольную зону 316, расположенную между зоной обнаружения 314 и вторым концом 310 хроматографической среды 306. Зона обнаружения 314 и контрольная зона 316 составлены так же, как обсуждалось ранее для других вариантов устройства, пригодного для проведения сэндвич-иммуноанализов. В состав второго противоблока 314 входит абсорбер 318, который может представлять собой подложку для абсорбента, и второй аппликатор 320. Первый 312 и второй 314 противоблоки соединены с помощью петли 322. Во втором противоблоке 314 имеется окно 324, позволяющее наблюдать за хроматографической средой 306. Первый и второй противоблоки 312 и 314 включают сцепки 323 и 325 и прокладку 326, как описано выше.

Вид сверху устройства 300 при замкнутой петле 322 показан на фиг. 12Б. Хроматографическая среда 306, включающая зону обнаружения 314 и, если она имеется, контрольную зону 316, просматривается через окно 324.

В этом варианте конструкции устройства добавление первой жидкости в первый аппликатор 312 вызывает ее нанесение на первый конец 308 хроматографической среды 306. В результате установки первого и второго противоблоков 302 и 304 друг против друга второй аппликатор 320 приходит в действующий контакт со вторым концом 310 хроматографической среды 306, прикладывая вторую жидкость ко второму концу 310 хроматографической среды 306 и заставляя абсорбер 318 прийти в действующий контакт с первым аппликатором 312 с целью отбора через первый аппликатор 312 жидкости из хроматографической среды 306, тем самым изменяя направление потока жидкости на противоположное. В процессе функционирования этого устройства образец наносят на первый аппликатор 312, а раствор меченого специфически связывающегося партнера - на второй аппликатор 320. После этого образец движется через хроматографическую среду 306 аналита, последний связывается с иммобилизованным антителом в зоне обнаружения 314. После установки первого и второго противоблоков 302 и 304 друг против друга меченый специфически связывающийся партнер прикладывается к хроматографической среде 306 и движется через хроматографическую среду 306 от второго ее конца 310 к первому 308. Меченый специфически связывающийся партнер соединяется затем с любым аналитом, связавшимся с иммобилизованным антителом в зоне обнаружения 314, образуя при этом детектируемый тройной комплекс. Меченый специфически связывающийся партнер, кроме этого, связывается с иммобилизованным аналитом или его аналогом в контрольной зоне 316, указывая на корректное проведение анализа.

м. Двухнаправленное устройство, включающее два аппликатора и проводник

Следующий вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением

представляет собой устройство, предназначенное для проведения двунаправленной хроматографии, которое включает в себя абсорбер для обращения потока и подложку для реагента в действующем контакте с хроматографической средой.

Этот вариант устройства для хроматографического анализа изображен на фиг. 13А. В аналитическом устройстве 340 имеется первый противоблок 342 и второй противоблок 344. На первом противоблоке 342 располагается хроматографическая среда 346, имеющая первый конец 348 и второй конец 350. Первый аппликатор 352 примыкает к первому концу 348 хроматографической среды 346 и находится с ним в действующем контакте. Проводник 354 примыкает ко второму концу 350 хроматографической среды 346 и находится с ним в действующем контакте. Хроматографическая среда 346 содержит зону обнаружения 356 и может дополнительно включать контрольную зону 358. На втором противоблоке 344 располагаются абсорбер 360 и второй аппликатор 362. Первый и второй противоблоки 342 и 344 соединены с помощью петли 364. Во втором противоблоке 344 имеется окно 366, позволяющее наблюдать за хроматографической средой 346. В состав первого и второго противоблоков 342 и 344 входят сцепки 365 и 367 и прокладка 368, как описано выше.

Когда первый и второй противоблоки 342 и 344 установлены друг против друга, абсорбер 360 приходит в действующий контакт с первым аппликатором 352, а второй аппликатор 362 - в действующий контакт с проводником 354, изменяя вследствие этого направление потока. При этом (первый и второй противоблоки 342 и 344 находятся в положении друг против друга) через окно 366 на втором противоблоке 344 можно наблюдать за частью хроматографической среды 346, включающей зону обнаружения 356 и контрольную зону 358, если она имеется.

На фиг. 13Б изображен вид сверху устройства 340 с первым и вторым противоблоками 342 и 344 в положении друг против друга; зона обнаружения 356 и контрольная зона 358 просматриваются через окно 366 на втором противоблоке 344.

В этом варианте устройства первый аппликатор 352 может содержать аппликаторную подложку для образца, на которую наносится анализируемый образец, а второй аппликатор 362 - буферную аппликаторную подложку для добавления буферного раствора. Первый аппликатор 352 (аппликаторная подложка для образца) может содержать по меньшей мере один реагент для обработки образца перед нанесением на хроматографическую среду, как описано выше. Второй аппликатор 362 (буферная аппликаторная подложка) обычно содержит специфически связывающегося партнера анализа в форме, способной к перерастворению за счет добавления водной фазы, как описано ранее.

Первый аппликатор 352 (аппликаторная подложка для образца) преимущественно также содержит инертный краситель, позволяющий визуально следить за

протеканием образца через хроматографическую среду 346. Желательно, чтобы этот инертный краситель имел цвет, контрастный с цветом обнаруживаемой метки. Например, в случае использования в качестве детектируемой метки розового коллоидного золота инертный краситель может быть синим. Наблюдение за красителем позволяет следить за передвижением образца. После того, как образец переместился на достаточное расстояние, например, на две трети или три четверти длины хроматографической среды 346, первый и второй противоблоки 342 и 344 устанавливают друг против друга, при этом абсорбер 360 приходит в контакт с первым аппликатором 352. Это реверсирует поток образца через хроматографическую среду 346, позволяя дополнительно захватывать аналит в зоне обнаружения 356. За счет этого также второй аппликатор 346 приходит в контакт с проводником 354, нанося на хроматографическую среду 346 буферный раствор, содержащий перерастворенного меченого специфически связывающегося партнера аналита. Буферный раствор перемещается через хроматографическую среду 346 от ее второго конца 350 к первому концу 348. В момент достижения им зоны обнаружения 356, меченый специфически связывающийся партнер аналита связывается с аналитом, ранее уже связанным в зоне обнаружения 356. После этого, также как описано ранее, производится обнаружение и/или определение аналита.

Поскольку первый и второй противоблоки 342 и 344 не соединены в момент нанесения образца в качестве первой жидкости на первый аппликатор 352, то безразлично, в какой очередности наносить образец в первый аппликатор 352 и буфер для перерастворения меченого специфически связывающегося партнера во второй аппликатор 362.

В одном из вариантов этого двунаправленного устройства проводник 354 на первом противоблоке 342 заменен на первый абсорбер ограниченной емкости 354. Абсорбер 360 на втором противоблоке 344 становится, таким образом, вторым абсорбером. Абсорбер ограниченной емкости 354 на первом противоблоке 344 способен оттягивать на себя жидкость, когда второй аппликатор 362, содержащий способного к перерастворению меченого специфически связывающегося партнера, находится с ним в действующем контакте, а второй абсорбер 360 размещается в действующем контакте с первым аппликатором 352.

н. Устройство с детекторной аппликаторной подложкой на первом блоке

Другой вариант конструкции двублочного устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением имеет детекторную аппликаторную подложку, расположенную на первом противоблоке, и зону приготовления образца, расположенную на втором противоблоке. В этом варианте устройства детекторная аппликаторная подложка находится в действующем контакте с первым концом хроматографической среды. Детекторная аппликаторная подложка в большинстве случаев содержит меченого специфически связанного партнера аналита в форме, способной к перерастворению

посредством добавления в нее водной фазы. Устройство также включает проводник в действующем контакте с детекторной аппликаторной подложкой и в непрямом контакте с первым концом хроматографической среды, а также абсорбер, находящийся в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды.

В процессе эксплуатации этого варианта устройства образец наносят в зону приготовления образца на втором противоблоке, после чего первый и второй противоблоки устанавливают друг против друга. За счет этого содержимое зоны приготовления образца прикладывается к проводнику и затем через детекторную аппликаторную подложку к первому концу хроматографической среды. Когда образец достигает детекторной аппликаторной подложки, ее содержимое перерастворяется. В тех случаях, когда содержимое детекторной аппликаторной подложки включает меченого специфически связывающегося партнера анализата, результатом прохождения через нее образца является связывание специфически связывающегося партнера и анализата, имеющегося в образце.

Этот вариант конструкции устройства показан на фиг. 14. В устройстве для анализа 380 имеется первый противоблок 382 и второй противоблок 384. Первый противоблок включает хроматографическую среду 386, имеющую первый конец 388 и второй конец 390. В состав первого противоблока 382 также входят детекторная аппликаторная подложка 392 в действующем контакте с первым концом 388 хроматографической среды 386, проводник 394 в действующем контакте с детекторной аппликаторной подложкой 392 и в непрямом контакте с первым концом 388 хроматографической среды 386 и абсорбер 396 в действующем контакте со вторым концом 390 хроматографической среды 386. В хроматографической среде 386 имеется зона обнаружения 398 и контрольная зона 400. Второй противоблок 384 включает зону приготовления образца 402. Первый и второй противоблоки 382 и 384 соединены с помощью петли 404. Во втором противоблоке 384 имеется отверстие 406, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды 386. Первый и второй противоблоки содержат сцепки 405 и 407 и прокладку 408, как описано ранее.

Разновидность этой конструкции предполагает возможность нахождения специфически связывающегося партнера анализата в форме, способной к перерастворению, как на втором противоблоке 384, так и на первом противоблоке 382. В том случае, когда способный к перерастворению специфически связывающийся партнер располагается на втором противоблоке 384, он обычно не находится непосредственно в самой зоне приготовления образца 402. Чаще он окружает зону приготовления образца 402 в некоторой области 403, таким образом, что образец первоначально проходит через зону приготовления образца 402, а затем движется в область 403, окружающую зону приготовления образца 402, перерастворяя специфически связывающегося партнера. Например, зона приготовления образца 402

может содержать кусочек обработанной нужным образом фильтровальной бумаги, помещенный на поверхность второго противоблока 384 и закрепленный связующим или скрепкой. Это позволяет производить подготовку образца, т.е. подводить рН, лизировать интактные клетки и/или удалять частицы до того момента, когда образец придет в контакт со способным к перерастворению специфически

связывающимся партнером. Этот вариант данной конструкции способен обеспечить широкий динамический диапазон и может быть полезен в тех случаях, когда антители обладают низкой аффинностью или необходимо обнаружить анализаты в низких концентрациях.

о. Устройство с двухсекторным аппликатором для обеспечения промывки

Еще один вариант конструкции двублочного устройства для анализа в соответствии с настоящим изобретением имеет двухсекторный аппликатор, обеспечивающий отмывку от образца, непрореагировавшего с меченым специфически связывающимся партнером после прохождения смеси образца и меченого специфически связывающегося партнера через хроматографическую среду. Преимущество этого варианта конструкции состоит в обеспечении чистого фона измерения и облегчении прочтения слабого позитивного результата.

В этом варианте конструкции первый противоблок включает хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы, проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды и абсорбер в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды. Второй противоблок включает аппликатор, разделенный на два сектора: первый - содержащий способного к перерастворению меченого специфически связывающегося партнера анализата, и второй - не содержащий его. Установка первого и второго противоблоков друг против друга приводит первый, но не второй, сектор аппликатора в прямой контакт с проводником, обеспечивая нанесение содержимого первого сектора аппликатора на проводник и затем на первый конец хроматографической среды. Второй сектор при этом помещается в не прямой контакт с проводником, так как содержимое второго сектора поступает на проводник через первый сектор. Таким образом, вслед за нанесением на проводник содержимого первого сектора, на него наносится содержимое второго сектора. Содержимое второго сектора, включающее образец, но не включающее меченого специфически связывающегося партнера, служит для вымывания несвязанного меченого специфически связывающегося партнера из хроматографической среды, уменьшая тем самым фон видимой метки в хроматографической среде и улучшая показания, даваемые устройством. Это бывает особенно полезным в слабо позитивных анализах.

Этот вариант конструкции устройства для анализа показан на фиг. 15. В устройстве для анализа 420 имеется первый противоблок 422 и второй противоблок 424. Первый противоблок 422 включает

хроматографическую среду 426 с первым концом 428 и вторым концом 430, проводник 432 в действующем контакте с первым концом 428 хроматографической среды 426 и абсорбер 434 в действующем контакте со вторым концом 430 хроматографической среды 426. Во втором противоблоке 424 имеется аппликатор 436, разделенный на два сектора; в случае, когда первый и второй противоблоки 422 и 424 установлены друг против друга, первый сектор 438 находится в прямом контакте с проводником 432, а второй сектор 440 - в непрямом контакте с проводником 432. Хроматографическая среда содержит зону обнаружения 442 и контрольную зону 444. Первый и второй противоблоки 422 и 424 соединены с помощью петли 446. Во втором противоблоке 424 имеется окно 448, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды 426. Первый и второй противоблоки 422 и 424 содержат сцепки 423 и 425 и прокладку 427, как описано ранее.

Б. Двублочное устройство с крышкой

Следующим вариантом конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением является двублочное устройство с крышкой.

Этот вариант конструкции устройства для анализа показан на фиг.16А. В состав устройства 460 входит первый противоблок 462, второй противоблок 464 и крышка 466. Второй противоблок 464 прикреплен к одной из сторон первого противоблока 462 с помощью петли 468. Крышка 466 прикреплена второй петлей 470 к противоположной стороне первого противоблока 462. В состав первого противоблока 462 входит хроматографическая среда 472, имеющая первый 474 и второй 476 концы. Первый аппликатор или подложка для образца 473, расположенный в углублении 480, подведен к первому концу 474 хроматографической среды 472 и находится с ним в действующем контакте. Первый аппликатор 478 может включать зону приготовления образца, содержащую, как описано выше, по меньшей мере один реагент для обработки образца перед его нанесением на хроматографическую среду. Первый аппликатор 473 может, как описано ранее, также содержать инертный краситель для индикации развития хроматографии. Первый абсорбер 482 подведен ко второму концу 476 хроматографической среды 472 и находится с ним в действующем контакте. Хроматографическая среда 472 содержит зону обнаружения 484 и контрольную зону 486 и может быть дополнительно размечена ограничительной линией 488. Ограничительная линия 488 может быть также нанесена и на первый противоблок 462. В состав второго противоблока 464 входят второй аппликатор 490, обычно содержащий меченого специфически связывающегося партнера аналита, и второй абсорбер 492. В крышке 466 имеется первое отверстие 494. Предпочтительно, чтобы второй противоблок 462 содержал второе отверстие 496. В этом устройстве второй противоблок 464 и крышка 466 дополнительно имеют сцепки 491 и 493. Также, как описано ранее, устройство 460 окружено по своему периметру прокладкой

495.

Вариант сборки устройства 460, в котором второй противоблок 464 наложен на первый противоблок 462, а крышка 466 помещена на второй противоблок 464, изображен на фиг. 16Б (вид сверху). Часть хроматографической среды 472, включающая зону обнаружения 484 и контрольную зону 486, видна через первое отверстие 494 в крышке 466 и через второе отверстие 496 во втором противоблоке 464.

В процессе эксплуатации этого устройства добавление первой жидкости в первый аппликатор 478 обуславливает ее нанесение на первый конец 474 хроматографической среды 472. Обычно первой жидкостью является образец, который может содержать аналит.

В этом устройстве функция углубления 480 на первом противоблоке 462 заключается в таком расположении второго абсорбера 492, при котором он мог бы находиться по меньшей мере частично в прямом контакте с хроматографической средой 472 с целью удаления избытка образца, одновременно удерживая первый аппликатор 478 от блокирования этого контакта.

В процессе использования образец добавляют в первый аппликатор 478 с тем, чтобы в хроматографической среде 472 могла происходить хроматография в направлении от первого конца 474 ко второму концу 476. В тот момент, когда краситель достигает ограничительной линии 488, первый и второй противоблоки 462 и 464 располагают один напротив другого, что приводит второй аппликатор 490 в действующий контакт с первым абсорбером 482 для нанесения второй жидкости на второй конец 476 хроматографической среды 472 и заставляет второй абсорбер 492 вступать в действующий контакт с первым аппликатором 478, отбирая через первый аппликатор 478 жидкость из хроматографической среды 472. Это реверсирует хроматографический поток и направляет меченого специфически связывающегося партнера через хроматографическую среду 472 от ее второго конца 476 к первому 474. Такое устройство, поэтому, полезно для проведения двунаправленной хроматографии.

Крышка 466 может обжимать второй противоблок 464 для более прочного закрепления и поддержания второго противоблока 464 напротив первого противоблока 462. Это делает более удобным хранение устройства после его использования в качестве медицинской документации.

В. Трехблочное устройство

Следующим вариантом конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением является трехблочное устройство для анализа, использующее двунаправленную хроматографию.

Этот вариант конструкции трехблочного устройства изображен на фиг. 17А. В состав аналитического устройства 520 входят первый противоблок 522, второй противоблок 524 и третий противоблок 526. Второй противоблок 524 соединен с помощью первой петли 528 с одной из сторон первого противоблока 522, а третий противоблок 526 соединен с помощью второй петли 530 с

противоположной стороной первого противоблока 522. В состав первого противоблока 522 входит хроматографическая среда 532, имеющая первый конец 534 и второй конец 536. Хроматографическая среда 532 содержит зону обнаружения 538 и контрольную зону 540. Первый проводник 542 находится в действующем контакте с первым концом 534 хроматографической среды 532, а второй проводник 544 находится в действующем контакте со вторым концом 536 хроматографической среды 532. Второй противоблок 524 включает первый абсорбер 546 и первый аппликатор 548, предназначенный для нанесения образца. Обычно первый аппликатор 548 содержит первого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению за счет нанесения водного раствора образца на первый аппликатор 548. Во втором противоблоке 524 прорезано первое отверстие 550, позволяющее проводить наблюдение по меньшей мере за частью хроматографической среды 532. Первое отверстие 550 размещается между первым абсорбером 546 и первым аппликатором 548. Третий противоблок 526 включает второй аппликатор 552, предназначенный для меченого вторичного специфически связывающегося партнера, и второй абсорбер 554. В третьем противоблоке 526 прорезано второе отверстие 556, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды 532. Второе отверстие 556 расположено между вторым аппликатором 552 и вторым абсорбером 554. Когда устройство 520 закрыто, то есть второй противоблок 524 наложен на первый противоблок 522, а третий противоблок 526 наложен на первый противоблок 522, через первое окно 550 и через второе окно 556 просматривается по меньшей мере часть хроматографической среды 532 (фиг. 17Б). Второй и третий противоблоки 524 и 526 содержат сцепки 551 и 555, скрепляющие противоблоки вместе. Края блоков окружает гибкий выступ или прокладка 557, удерживающая реагенты или образцы внутри устройства 520. Аналогичная конструкция сцепок и уплотнения или прокладки используется и для других, описываемых далее трехблочных устройств.

В этом устройстве установка первого и второго противоблоков 522 и 524 друг против друга приводит первый абсорбер 546 в состояние действующего контакта со вторым проводником 544, а первый аппликатор 548 - в действующий контакт с первым проводником 542, вызывая тем самым нанесение жидкости на хроматографическую среду 532, так что первая жидкость, приложенная к первому аппликатору 548, проходит по меньшей мере часть хроматографической среды 532, включающую зону обнаружения и контрольную зону 540.

После этого первый и второй противоблоки 522 и 524 разъединяют, а первый и третий противоблоки 522 и 526 устанавливают друг против друга. В результате этого второй абсорбер 554 приходит в действующий контакт с первым проводником 542 для удаления жидкости из хроматографической среды 532, а второй

аппликатор 552 приходит в действующий контакт со вторым проводником 544 для нанесения жидкости на хроматографическую среду 532. Это вызывает такое обращение потока, при котором вторая жидкость, нанесенная на второй аппликатор 552, проходит по меньшей мере часть хроматографической среды 532, через которую перед этим прошла первая жидкость, но в противоположном направлении. Форма первого 522, второго 524 и третьего 526 противоблоков такова, что когда третий противоблок 526 установлен против первого противоблока 522, второй противоблок 524 может быть наложен на первый и третий противоблоки, образуя крышку.

При проведении серологических анализов с использованием этого устройства важным является надежное прижатие второго абсорбера 554 к первому проводнику 542, гарантирующее вымывание неспецифического иммуноглобулина из хроматографической среды 532 до начала продвижения по ней фронта меченого вторичного специфически связывающегося партнера, или, в другом случае, гарантирующее вымывание свободного аналита до начала продвижения меченого специфически связывающегося антианалита. Если произойдет смешивание антииммуноглобулиновой метки и неспецифического иммуноглобулина, неспецифический иммуноглобулин нейтрализует антииммуноглобулиновую метку (конъюгат), оставляя меньше возможностей, или не оставляя их совсем, для мечения специфически связываемого иммуноглобулина. Третий противоблок 526 устройства помогает поддерживать согласованным прилагаемое давление для надежного выполнения этой функции. В этом состоит одно из преимуществ устройств для анализа, выполненных в соответствии с настоящим изобретением.

Первый специфически связывающийся партнер может быть прямо помечен детектируемой меткой. Альтернативно может быть использовано не прямое мечение первого специфически связывающегося партнера. При использовании непрямого мечения первый специфически связывающийся партнер не содержит метки, но он детектируется за счет применения меченого вторичного специфически связывающегося партнера, который его специфически связывает, благодаря наличию в устройстве второго аппликатора. Непрямое мечение особенно полезно для тестирования Giardia или других антигенов, коммерчески доступные антитела к которым могут быть помечены лишь с большими трудностями. Когда первый специфически связывающийся партнер не помечен прямо, второй аппликатор 552 преимущественно содержит меченого вторичного специфически связывающегося партнера к первому специфически связывающемуся партнеру, как будет обсуждаться ниже в разделе III.

В другом варианте конструкции трехблочного устройства используется абсорбер на третьем блоке, помещенный для удаления жидкости со всей хроматографической среды, и элементы в действующем контакте с ним. Он служит для удаления избытка образца, который может

вызывать фоновую окраску, уменьшая тем самым чувствительность.

Этот вариант конструкции показан на фиг. 18. В аналитическом устройстве 560 имеются первый противоблок 561, второй противоблок 562 и третий противоблок 563. Второй противоблок 562 присоединен с помощью первой петли 564 к одной из сторон первого противоблока 561. Третий противоблок 563 с помощью второй петли 565 присоединен к другой стороне первого противоблока 561. Первый противоблок 561 содержит хроматографическую среду 566, имеющую первый конец 567 и второй конец 568. Первый аппликатор 569 расположен рядом и находится в действующем контакте с первым концом 567 хроматографической среды 566. Проводник 570 расположен рядом со вторым концом 568 хроматографической среды 566 и находится с ним в действующем контакте. Хроматографическая среда содержит зону обнаружения 571 и может дополнительно содержать контрольную зону 572. Второй противоблок 562 включает первый абсорбер 573 и второй аппликатор 574, обычно содержащий меченого специфически связывающего партнера аналита в форме, способной к перерастворению. В состав третьего противоблока 563 входят второй абсорбер 575, вытянутый по существу вдоль всей длины хроматографической среды 566 для удаления жидкости из хроматографической среды 566, первый аппликатор 569 и проводник 570 в том случае, когда третий противоблок 563 установлен против первого противоблока 561. В первом противоблоке 561 имеется отверстие 576, расположенное сзади хроматографической среды 566 и позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды 566 на обратной стороне первого противоблока 561. Второй и третий противоблоки 562 и 563 также содержат сцепки 577 и 579 и прокладку 580, как описано выше.

В процессе использования анализируемый образец наносится на первый аппликатор 569, а буферный раствор - на второй аппликатор 574. Далее образцу позволяют пройти через хроматографическую среду 566, включая зону обнаружения 571 и контрольную зону 572. После этого первый и второй противоблоки 561 и 562 помещают друг против друга, в результате чего второй аппликатор 574 начинает контактировать с первым аппликатором 569, а первый абсорбер 573 - с проводником 570 на втором конце 568 хроматографической среды 566. Это заставляет перерастворенного меченого специфически связывающегося партнера, первоначально находившегося на втором аппликаторе 574, двигаться через хроматографическую среду. После завершения движения растворов образца и перерастворенного специфически связывающегося партнера через хроматографическую среду 566 третий противоблок помещают против первого противоблока 561, в результате чего второй абсорбер 575 может удалять жидкость из хроматографической среды 566, первого аппликатора 569 и второго аппликатора 570. Вслед за этим второй противоблок 562 повторно накладывают на третий противоблок 563 и наблюдают за хроматографической

средой 566, включающей зону обнаружения 567 и контрольную зону 568, через отверстие 576, расположенное позади хроматографической среды 566.

Г. Множественные устройства

Еще один вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой множественное устройство, способное осуществлять многочисленные анализы одновременно. Могут быть проведены анализы одного и того же аналита, либо различных аналитов. В целом, все описанные ранее устройства подходят для множественного использования благодаря наличию в них первого, второго и, если необходимо, то и третьего противоблоков, на которых находится большое число хроматографических сред, зон приготовления образца, аппликаторов, проводников, абсорберов и других необходимых элементов.

1. Основное множественное устройство

Одна из версий множественного аналитического устройства в соответствии с настоящим изобретением показана на фиг. 19. В аналитическом устройстве 590 имеется первый противоблок 592 и второй противоблок 594. Второй противоблок 594 шарнирно соединен посредством петли 596 с первым противоблоком 592. Первый противоблок 592 включает большое число хроматографических сред 598. Каждая из хроматографических сред 598 имеет первый конец 600 и второй конец 602, содержит зону обнаружения 604 и контрольную зону 606. Второй конец 602 каждой хроматографической среды 598 находится в действующем контакте с абсорбером 608, обеспечивающим протекание жидкости через хроматографическую среду 598. Свой отдельный абсорбер 608 имеется для каждой из хроматографических сред 598. Второй противоблок 594 включает большое число зон приготовления образца 610 по одной на каждую хроматографическую среду 598. Обычно каждая зона приготовления образца 610 содержит меченого специфически связывающегося партнера тестируемого аналита в форме, способной к перерастворению после добавления жидкого образца в зону приготовления образца 610. В альтернативном случае меченый специфически связывающийся партнер, находящийся в жидкой форме, может быть добавлен в зону приготовления образца 610 до или после добавления в нее образца. Установка первого и второго противоблоков 592 и 594 друг против друга вызывает приложение каждой из зон приготовления образца 610 к соответствующей хроматографической среде 598 в области ее первого конца 600. Во втором противоблоке 594 имеется большое число отверстий 612, по одному на каждую хроматографическую среду 598. Первый и второй противоблоки 592 и 594 имеют сцепки 614 и 616 и прокладку 618, такие же, как описаны выше.

Такое множественное устройство в зависимости от условий анализа может содержать от 2 до 12 или более зон приготовления образца и хроматографических сред. Чаще всего оно содержит от 2 до 5 отдельных зон приготовления образца и



хроматографических сред.

Такой вариант конструкции устройства можно использовать для анализа различных аналитов, содержащихся в разных аликвотах одного и того же образца, или для анализа одного аналита в различных образцах. Последнее особенно удобно в том случае, когда необходимо проанализировать образцы, взятые у одного и того же пациента в различные периоды времени, как, например, при анализе скрытой фекальной крови. Наличие скрытой фекальной крови часто определяется в серии анализов образцов стула, взятых один раз в день или через другие интервалы времени предписанного периода. В других случаях один или более анализов могут быть проделаны для измерения контрольных образцов или стандартов сравнения.

2. Множественное устройство со складным углублением

В еще одном варианте множественного устройства по меньшей мере одна из зон приготовления образца может содержать складное углубление, в которое может быть помещен тампон для экстракции или другое содержащее образец устройство. В таком варианте конструкции первый противоблок может дополнительно включать петлеобразно прикрепленные, способные сгибаться крылья, охватывающие второй противоблок, начиная с того момента, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга.

Эта разновидность множественного устройства изображена на фиг. 20. В устройстве 620 имеется первый противоблок 622 и второй противоблок 624. Второй противоблок 624 посредством петли 626 шарнирно соединен с первым противоблоком 622. К первому противоблоку 622 шарнирно крепятся два способных сгибаться крыла 628 и 630. В первом противоблоке 622 имеются контрольное углубление 632 и складное углубление для образца 634, например, выполненное из губкообразного материала. Второй противоблок содержит несколько хроматографических сред 636, в данном случае - две, каждая из которых имеет зону обнаружения 638 и контрольную зону 640. Во втором противоблоке имеется отверстие 642 для наблюдения за частью каждой из хроматографических сред, включая зоны обнаружения 638 и контрольные зоны 640. Первый и второй противоблоки 622 и 624 содержат сцепки 641 и 643. Когда первый противоблок 622 и второй противоблок 624 расположены друг против друга, образцы, находящиеся в контрольном углублении 632 и складном углублении 634, прикладываются каждый к соответствующей хроматографической среде 636 для хроматографии.

3. Множественные устройства, адаптированные для введения тестовой карты

Следующий вариант множественного устройства может быть особенно полезен для определения гемоглобина в скрытой фекальной крови. Это устройство адаптировано для введения тестовой карты, включающей несколько высушенных фекальных образцов, обычно взятых в последовательные дни.

Это устройство показано на фиг. 21. Аналитическое устройство 660 включает

первый противоблок 662, второй противоблок 664, шарнирно соединенный посредством первой петли 666 с первым противоблоком 662, и третий противоблок 668, шарнирно соединенный с первым противоблоком 662 при помощи второй петли 670. Первый противоблок 662 приспособлен для введения тестовой карты 672, содержащей установленные в ней высушенные образцы 674. Во втором противоблоке 664 имеется вмонтированная подложка для образца 676. Третий противоблок 668 включает множество хроматографических сред 678, каждая из которых содержит зону обнаружения 630 и контрольную зону 682, как описано выше. Для каждого анализируемого образца имеется, таким образом, своя хроматографическая среда 678. В третьем противоблоке 668 имеется отверстие 684, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды 678, включающей каждую из зон обнаружения 680 и контрольных зон 682. Второй и третий противоблоки содержат сцепки 681 и 685 с устройством 660, включающим прокладку 686, как и в ранее описанном случае трехблочных устройств.

В процессе использования устройства тестовую карту 672, содержащую множество высушенных образцов 674, вводят во второй противоблок 664. Второй противоблок 664 помещают поверх первого противоблока 662, содержащего подложки для реагента 676, таким образом, что подложки для реагента 676 начинают контактировать с высушенными образцами 674 тестовой карты 672 и экстрагировать из них аналит. После этого второй противоблок 664 снимают с первого противоблока 662. Наконец, третий противоблок 668 помещают поверх первого противоблока 662 для нанесения содержимого реагентных подложек 676 и аналита, экстрагированного из высушенных образцов 674, на хроматографическую среду 678 с тем, чтобы смогла начаться хроматография.

В этом устройстве подложки для реагента 676 содержат специфически связывающегося партнера аналита, меченного детектируемой меткой, в форме, способной к перерастворению за счет добавления к подложкам для реагента 676 водного раствора реагента. Добавляемым реагентом является реагент для экстракции анализируемого аналита, такого как гемоглобин.

Когда второй противоблок 664 установлен против первого противоблока 662, аналит экстрагируется из образцов тестовой карты 672 и связывается с меченым специфически связывающимся партнером. Когда третий противоблок 668 вслед за этим помещается против второго, весь связавшийся со специфически связывающимся партнером аналит движется через хроматографическую среду 668 и связывается в зоне обнаружения 680 в каждой из хроматографических сред 678.

Еще один вариант множественного устройства в соответствии с настоящим изобретением представляет собой множественное устройство подобное тому, которое изображено на фиг. 19, но также адаптированное для введения тестовой карты. Тестовая карта может содержать



множество образцов, таких как высушенные фекальные образцы, в случае проведения теста на скрытую фекальную кровь.

Эта разновидность показана на фиг. 22. В аналитическом устройстве 700 имеются первый противоблок 702 и второй противоблок 704. Второй противоблок 704 шарнирно скреплен с помощью петли 706 с первым противоблоком 702. Первый противоблок 702 включает множество хроматографических сред 708. Каждая хроматографическая среда 708 имеет первый конец 710 и второй конец 712, а также включает зону обнаружения 718 и контрольную зону 720. Первый конец 710 каждой хроматографической среды 708 находится в действующем контакте с проводником 714, а второй конец 712 каждой хроматографической среды 708 - в действующем контакте с абсорбером 716. Для каждой хроматографической среды 708, таким образом, имеются свои отдельные проводник 714 и абсорбер 716. Первый противоблок 702 приспособлен для введения тестовой карты 722, содержащей множество высушенных образцов 724, расположенных в действующем контакте каждый со своим проводником 714. В состав второго противоблока 704 входит множество аппликаторов 726, по одному на каждую хроматографическую среду 708. Каждый из аппликаторов 726 преимущественно содержит меченого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению.

В процессе использования буферный или другой водный раствор наносится на каждый из аппликаторов 726 для восстановления меченого специфически связывающегося партнера. Установление первого и второго противоблоков 702 и 704 друг против друга вызывает приложение каждого из аппликаторов 726 к соответствующему высушенному образцу 724, в результате чего содержимое каждого высушенного образца 724 и каждого аппликатора 726 оказывается приложенным к своему проводнику 714 и, таким образом, к своей хроматографической среде 708. Тестовая карта 722 удерживает каждый образец 724 в таком положении, при котором они могут получать содержимое аппликаторов 726, вследствие чего происходит экстракция содержащегося в них аналита, его взаимодействие со специфически связывающимся партнером и нанесение на проводники 714. Во втором противоблоке 704 имеется множество отверстий 728, по одному на каждую хроматографическую среду 708, для наблюдения за всеми хроматографическими средами 708. Каждый из противоблоков 702 и 704 содержит сцепки 725 и 727 и прокладку 730, необходимую для удержания образцов и реагентов внутри устройства.

## II УСТРОЙСТВА ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КОНКУРЕНТНЫХ АНАЛИЗОВ

Аналитические устройства, схожие по конструкции с описанными ранее, могут быть использованы для конкурентных анализов моновалентных аналитов. Типичными моновалентными аналитами являются гаптены, но те же принципы могут быть использованы для анализа любых

моновалентных аналитов, таких как мультивалентные в норме антигены, у которых дополнительные сайты связывания антитела заблокированы или модифицированы. Анализу могут быть подвергнуты следующие аналиты: теофиллин, дигоксин, дизопирамид, лидокаин, прокаинамид, пропранолол, хинидин, амикацин, пенициллин и другие β-лактамы антибиотики, хлорамфеникол, гентамицин, канамицин, нетилмицин, тобромицин, трициклические антидепрессанты, этосукцимид, фенобарбитал, диазепам, фенитоин, примидон, вальпроевая кислота, ацетаминофен, ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, метотрексат, незаконные лекарства, приводящие к злоупотреблению ими, такие как морфин, кодеин, кокаин, фентанил, 3-метилфентанил, амфетамины, лизергиновой кислоты диэтиламид, фенициклидин и героин и их метаболиты, ДНФ, 1-замещенные-4-окси-2-нитробензолы, 4-замещенные-2-нитротриалкиланилиновые соли и загрязнители окружающей среды, такие как бензол, толуол, ксилол, этилбензол, хлордан, ДДТ и ее метаболиты 2,4-Д, 2,4,5-Т и атразин.

Специфически связывающиеся партнеры, пригодные для проведения этих анализов, включают в себя (но не ограничиваются) антитела и специфически связывающиеся белки. Примером последних может служить пенициллинсвязывающий белок (ПСБ), выделенный из *Bacillus stearothermophilus*.

Устройства для проведения конкурентных иммуноанализов, выполненные в соответствии с настоящим изобретением, в отличие от своих предшественников имеют то преимущество, что наличие аналита в образце дает позитивный или детектируемый результат в каждом случае в виде окрашенной линии в зоне обнаружения устройства. Обычно же при проведении конкурентного иммуноанализа наличие детектируемого сигнала означает отрицательный результат (отсутствие аналита в пробе). Таким образом, существует обратная взаимосвязь между наблюдаемым результатом и обнаружением аналита. Устройства, представленные в настоящем изобретении, обеспечивающие прямую взаимосвязь между концентрацией аналита и детектируемым сигналом, с меньшей вероятностью дают ошибочные, отрицательные результаты. Кроме этого, данные устройства обладают расширенным динамическим диапазоном.

А. Трехблочное устройство с двунаправленным потоком

Одним из вариантов конструкции устройства, предназначенного для проведения конкурентных иммуноанализов, в соответствии с настоящим изобретением является трехблочное двунаправленное проточное устройство.

В устройстве имеется три противоблока. Первый противоблок включает в себя хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы; поток в первом направлении осуществляется от первого конца ко второму концу, а во втором направлении - от второго к первому. В отдельных областях хроматографической среды, значительно меньших по размеру, чем сама хроматографическая среда,

иммобилизован аналит или его иммунологический аналог.

Предпочтительным иммунологическим аналогом аналита является аналит, ковалентно связанный с белком, лишенным специфически связывающей активности к аналиту, таким как нормальный IgG или другой невосприимчивый к аналиту IgG. Такой IgG чаще всего очищают абсорбцией против анализируемого аналита с целью удаления иммуноглобулиновых фракций со специфически связывающей активностью а также природных антител и антител, способных к перекрестной реакции с аналитом.

Способы конъюгации гаптенa с белками, включая неиммунные IgG, хорошо известны и описаны, например в [8]. Вкратце, гаптены, содержащие карбоксильные группы или группы, которые могут быть карбоксилированы, могут присоединяться посредством смешанной ангидридной реакции, реакции с водорастворимым карбодимидом или в результате этерификации N-гидроксисукцинимидом. Карбоксилирование может быть проведено при помощи таких реакций, как алкилирование заместителей при атомах кислорода и азота галозфирами с последующим гидролизом таких эфиров, или путем образования гемисукцинатных эфиров либо карбоксиметил оксидов на гидроксильных или кетогруппах стероидов.

Гаптены с аминогруппами или нитрогруппами, которые могут быть восстановлены до аминогрупп, можно перевести в соли диазония, способные реагировать с белками при мягких щелочных значениях pH, в случае ароматических аминов. Гаптены с алифатическими аминами могут быть сконъюгированы с белками различными методами, включающими реакцию с карбодимидом, реакцию с гомобифункциональным реагентом толуол-2,4-диизоцианатом, или реакцию с содержащими имид малеиновой кислоты соединениями. Алифатические амины, кроме этого, можно перевести в ароматические амины с помощью реакции с п-нитробензоилхлоридом и последующим восстановлением до п-аминобензоиламида, который может быть затем присоединен к белкам после диазотирования. Кроме этого, для конъюгирования с белками гаптенa, содержащих аминогруппы, могут использоваться бифункциональные имидатные эфиры, такие как диметилпимелидат, диметиладипимидат или диметилсуберимидат.

Тиолсодержащие гаптены могут быть сконъюгированы с белками с помощью имидов малеиновой кислоты (малеимидов), таких как N-оксисукцинимидный эфир 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоновой кислоты.

Гидроксильные группы гаптенa могут быть переведены в гемисукцинаты, благодаря чему в эти соединения вводятся карбоксильные группы, пригодные для конъюгации. В альтернативном случае бифункциональный реагент себацилдихлорид может быть использован для превращения спирта в кислый хлорид, который затем реагирует с белками.

Фенолы могут быть активированы

диазотированной п-аминобензойной кислотой, вводящей карбоксильную группу, и могут затем реагировать с белками посредством смешанной ангидридной реакции. Сахара можно активировать путем образования п-нитрофенилглюкозида с последующим восстановлением нитрогруппы до аминогруппы и конъюгацией в результате диазотирования. Другие методы включают расщепление вициновых гликолей сахаров до альдегидов в реакции с периодатом с последующим присоединением к аминам посредством восстановительного алкилирования боргидридом натрия. В альтернативном случае, гидроксилсодержащие гаптены могут быть конъюгированы после их перевода в хлоркарбонаты в реакции с фосгеном.

В гаптены с альдегидными и кетогруппами можно ввести карбоксильные группы через образование о-карбоксиметил оксидов. Производные кетогрупп могут еще быть получены с помощью п-гидразинбензойной кислоты с образованием карбоксильных групп. Гаптены с альдегидными группами могут быть непосредственно сконъюгированы с белками через образование Шиффовых оснований, которые стабилизируются в реакции с восстанавливающими агентами, такими как боргидрид натрия.

В качестве хроматографической среды предпочтительно использовать нитроцеллюлозу, с которой аналог аналита связывается нековалентно за счет гидрофобных взаимодействий. Может быть использована и другая хроматографическая среда с ковалентно связанным аналогом аналита.

Первый противоблок дополнительно содержит первый проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды и второй проводник - в действующем контакте со вторым ее концом.

Второй противоблок включает первый аппликатор, содержащий первого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению путем добавления в первый аппликатор первой водной фазы. Ею может являться сам образец, однако преимущественно это комбинация образца и первой восстанавливающей жидкости, причем сначала добавляется первая восстанавливающая жидкость.

Третий противоблок включает второй аппликатор, содержащий второго специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению за счет добавления в аппликатор второй восстанавливающей жидкости. Второй специфически связывающийся партнер помечен детектируемой меткой, предпочтительно такой, которую можно детектировать визуально, как например описанная выше коллоидная золотая метка. Третий противоблок кроме этого включает абсорбер, отделенный от второго аппликатора, находящегося на этом противоблоке.

Первый и второй специфически связывающиеся партнеры обычно представляют собой антитела к аналиту. Они могут быть одинаковыми, но это не обязательно. Вместо интактных бивалентных

антител могут быть использованы их моновалентные фрагменты, такие как Fab или Fab'. Это может быть предпочтительным в некоторых случаях ввиду того, что при проведении таких конкурентных анализов не требуется, чтобы молекула антитела реагировала более чем с одним соответствующим анализом.

В процессе использования, первый специфически связывающийся партнер, находящийся в первом аппликаторе, перерастворяется преимущественно путем добавления самого образца или, в альтернативном варианте, путем добавления первой восстанавливающей жидкости, предшествующего добавлению образца. Второй специфически связывающийся партнер, находящийся во втором аппликаторе, также переводится в растворенное состояние за счет добавления второй восстанавливающей жидкости. Обычно первая и вторая восстанавливающие жидкости представляют собой одну и ту же жидкость. Преимущественно она

представляет собой буферный раствор, который может содержать дополнительные компоненты, такие как хелатирующие агенты, детергенты, антимикробные соединения и консерванты.

Подходящую восстанавливающую жидкость можно приготовить смешением равных объемов 0,1 М фосфатного буферного раствора, pH 7,2, содержащего 0,8% твин-20, и 2,5 мМ HEPES буфера, pH 7,5, содержащего 0,005% тритон X-100, 0,003% ЭДТА тетранатриевую соль и 0,05% азида натрия. Предпочтительно, чтобы объем восстанавливающей жидкости, вносимой в первый и второй аппликаторы, составляет от 5 до 200 мкл, более предпочтительно - от 10 до 100 мкл и в наилучшем варианте - 20 мкл. Объем раствора образца может составлять от 5 до 40 мкл, причем объем примерно в 30 мкл является наиболее предпочтительным.

После нанесения образца на первый аппликатор устройство инкубируют для обеспечения перерастворения специфически связывающегося партнера и прохождения реакции между первым специфически связывающимся партнером и анализом. Предпочтительный период инкубации составляет приблизительно от 5 до 30 минут, наиболее предпочтительный - примерно 15 минут. Инкубация обычно проводится при комнатной температуре, но может осуществляться и при более низких или более высоких температурах. Повышение температуры инкубации может ускорить реакцию; инкубация при пониженных температурах может быть желательна для предотвращения окисления или другого повреждения чувствительных образцов.

По окончании инкубации первый и второй противоблоки устанавливаются друг против друга, в результате чего образец и перерастворенный первый специфически связывающийся партнер анализа наносятся на первый проводник и затем на первый конец хроматографической среды. После этого образцу и перерастворенному специфически связывающемуся партнеру позволяют пройти по меньшей мере часть хроматографической среды и миновать анализ или его иммунологический аналог, иммобилизованный в отдельной ее области.

Обычно для этого требуется приблизительно от 10 до 20 секунд.

В этот момент первый и второй противоблоки отделяют друг от друга, а первый и третий - устанавливают друг напротив друга для приведения абсорбера в контакт с первым проводником, а второго аппликатора - в контакт со вторым проводником. Это заставляет абсорбер отбирать жидкость с первого конца хроматографической среды, а второй аппликатор - прикладывать, ко второму ее концу жидкость, содержащую перерастворенного меченого специфически связывающегося партнера. Предпочтительно, чтобы второй противоблок был наложен на первый и третий противоблоки, обеспечивая выдавливание достаточного количества жидкости из второго аппликатора и абсорбцию жидкости абсорбером, с тем чтобы обращение потока было эффективным. Давление, оказываемое на хроматографическую среду в результате наложения второго блока усиливает обращение потока.

После этого меченому перерастворенному специфически связывающемуся партнеру позволяют пройти по меньшей мере часть хроматографической среды, перекрывающую ту ее часть, которую перед этим преодолели образец и первый специфически связывающийся партнер и которая включает отдельную область, содержащую иммобилизованный анализ или его иммунологический аналог. Если анализ присутствует в образце, меченый специфически связывающийся партнер связывается в этой отдельной области и детектируется. В случае использования визуально обнаруживаемой метки, в отдельной области появляется видимая линия.

Анализ может проводится как качественный анализ, т.е. есть/нет анализ. В этом случае первый специфически связывающийся партнер присутствует в такой концентрации, при которой связывается фактически весь иммобилизованный в дискретной области анализ или его иммунологический аналог. Сайты связывания первого специфически связывающегося партнера в дискретной области оказываются полностью заблокированными для дальнейшего связывания. Если в образце присутствует анализ, он связывается с первым специфически связывающимся партнером, препятствуя дальнейшему связыванию последнего с иммобилизованным в дискретной области хроматографической среды анализом или его иммунологическим аналогом. В результате этого, второй, меченый специфически связывающийся партнер имеет возможность связаться в дискретной области с иммобилизованным анализом или его иммунологическим аналогом, давая детектируемый сигнал.

В варианте количественного анализа можно использовать две или более хроматографических сред в одном устройстве, по меньшей мере одна из которых предназначена для контрольного стандарта, используемого в качестве сравнения.

Устройство, пригодное для проведения такого варианта конкурентного анализа изображено на фиг. 23. В устройстве для

хроматографического анализа 740 имеются первый противоблок 742, второй противоблок 744 и третий противоблок 746. Второй противоблок 744 с помощью первой петли 748 шарнирно прикреплен к одной из сторон первого противоблока 742. Третий противоблок 746 с помощью второй петли 750 шарнирно прикреплен к другой стороне первого противоблока 742. Первый противоблок 742 включает хроматографическую среду 752, имеющую первый конец 754 и второй конец 756, первый проводник 758 в действующем контакте с первым концом 754 хроматографической среды 752 и второй проводник 760 в действующем контакте со вторым концом 756 хроматографической среды 752. Хроматографическая среда 752 также содержит дискретную область 762 иммобилизованного на ней аналита или его иммунологического аналога, как обсуждалось выше, которая показывает результат анализа.

Во втором противоблоке 744 имеется первый аппликатор 764, содержащий первого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению, на который обычно наносится образец.

В третьем противоблоке 745 имеется второй аппликатор 766, содержащий второго специфически связывающегося партнера аналита, меченного детектируемой меткой и присутствующего в форме, способной к перерастворению в результате добавления во второй аппликатор 755 второй водной фазы. Третий противоблок 746 содержит абсорбер 768, отделенный от второго аппликатора 766. В третьем противоблоке 746 также имеется отверстие 770 для наблюдения по меньшей мере за частью хроматографической среды 752, включающей дискретную область 762. В альтернативном варианте, отверстие 772 может быть расположено сзади дискретной области 762 хроматографической среды 752 на первом противоблоке 742 для наблюдения с задней стороны устройства 740, находящегося в закрытом состоянии. В состав второго и третьего противоблоков 744 и 746 входят сцепки 769 и 773, устройство 740 включает прокладку 774 для удержания внутри него реагентов.

Когда первый противоблок 742 и второй противоблок 744 установлены друг напротив друга, первый аппликатор 764 приходит в действующий контакт с первым проводником 758, при этом содержимое первого аппликатора 764 прикладывается к первому проводнику 758 и затем к первому концу 754 хроматографической среды 752. В случае, когда третий и первый противоблоки 746 и 742 установлены друг против друга, абсорбер 768 приходит в действующий контакт с первым проводником 758, соседствующим с первым концом 754 хроматографической среды 752, а второй аппликатор 766 - в действующий контакт со вторым проводником 760, расположенным вблизи второго конца 756 хроматографической среды 752, изменяя на противоположное направление потока жидкости через хроматографическую среду 752.

Б. Двублочное устройство с двунаправленным потоком, имеющее крышку. Вторым вариантом конструкции хроматографического устройства для

проведения конкурентных анализов в соответствии с настоящим изобретением является двублочное устройство с двумя направлениями потока, имеющее крышку. В этом варианте исследуемый образец не подвергают предварительной инкубации совместно с антителом, а наносят непосредственно на проводник, находящийся в прямом контакте с хроматографической средой.

Второй вариант конструкции хроматографического устройства для конкурентного иммуноанализа может включать первый противоблок и второй противоблок. На первом противоблоке имеется хроматографическая среда, имеющая первый и второй концы. Хроматографическая среда содержит иммобилизованных на ней: (1) первого специфически связывающегося партнера аналита; и (2) вторичного специфически связывающегося партнера, способного связываться с элементом специфически связывающейся пары, лишенным аффинности к аналиту. Эти компоненты располагаются на хроматографической среде в отдельных дискретных и неперекрывающихся областях. Вторичный специфически связывающийся партнер помещается ближе к первому концу хроматографической среды, чем первый специфически связывающийся партнер аналита. Для увеличения эффективности анализа предпочтительно, чтобы расстояние между первым специфически связывающимся партнером и вторичным специфически связывающимся партнером на хроматографической среде составляло примерно 0,25 дюйма (6,35 мм).

Первым специфически связывающимся партнером аналита, также как излагалось ранее, обычно является антитело или фрагмент антитела к аналиту.

Вторичным специфически связывающимся партнером обычно является антитело, способное связываться с другим иммуноглобулином при помощи видо-специфических детерминант связываемого иммуноглобулина, а не за счет специфичности как антитела, если она имеется. Например, вторичным специфически связывающимся партнером может быть антитело из овцы на IgG кролика, которое связывает все молекулы иммуноглобулина G независимо от их иммунологической специфичности.

Первый противоблок, кроме этого, включает первый проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды и второй проводник в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды. Желательно, чтобы первый противоблок был промаркирован ограничительной линией, указывающей то место, с которого должно начинаться обращение потока при проведении двунаправленного хроматографического процесса.

Второй противоблок включает: (1) аппликатор, содержащий аналог аналита в форме, способной к перерастворению за счет добавления в него восстанавливающей жидкости; и (2) отделенный от аппликатора абсорбер.

Аналог аналита представляет собой

аналит, ковалентно связанный с элементом специфически связывающейся пары, способным к связыванию с вторичным специфически связывающимся партнером. Этот элемент специфически связывающейся пары, входящий в состав аналога аналита, метится детектируемой меткой. Предпочтительной детектируемой меткой является визуально детектируемая метка. Наиболее предпочтительным является использование визуально детектируемой метки в виде золя металла, такой как золь золота, серебра или меди.

Например, когда вторичным специфически связывающимся партнером является антитело из овцы против кроличьего IgG, элементом специфически связывающейся пары, сконъюгированным с аналитом, будет обычный IgG кролика без иммунологической активности к аналиту.

Примером аналога аналита, подходящим для этого варианта анализа в случае, когда аналитом является пенициллин, может служить 7-аминоцефалоспоровая кислота, ковалентно связанная с кроличьим IgG, меченным коллоидным золотом.

Установка первого и второго противоблоков друг против друга помещает второй проводник в действующий контакт с аппликатором, в результате чего содержимое аппликатора прикладывается ко второму проводнику и проходит по меньшей мере через часть хроматографической среды. Кроме этого, абсорбер приходит в действующий контакт с первым проводником для отбора жидкости с первого конца хроматографической среды и изменения в ней направления потока на противоположное.

Во время фазы потока в первом направлении аналит, если он имеется в образце (позитивный образец), беспрепятственно проходит ту область хроматографической среды, где иммобилизован вторичный специфически связывающийся партнер, и связывается затем в области иммобилизаций первого специфически связывающегося партнера аналита. Для позитивного образца во время второй фазы потока, фазы с обратным направлением, связывание меченого аналога аналита с первым специфически связывающимся партнером заблокировано, и вследствие этого он связывается со вторичным специфически связывающимся партнером. Если в образце аналит отсутствует, то его связывания с первым специфически связывающимся партнером во время первой фазы потока не происходит; аналог же аналита при противоположном направлении потока связывается с первым специфически связывающимся партнером, не достигая при этом зоны иммобилизации вторичного специфически связывающегося партнера и не вызывая образования сигнала в этой зоне.

Предпочтительным является дополнительное наличие в устройстве крышки, шарнирно прикрепленной к первому противоблоку так, что она может накрывать первый и второй противоблоки, находящиеся в рабочем состоянии. В крышке может быть проделано отверстие, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды первого и второго противоблока в момент работы устройства. В

альтернативном варианте отверстие располагается позади хроматографической среды и наблюдение производится со стороны задней части закрытого устройства.

Данное устройство может также содержать две или более хроматографических сред в одном корпусе, из которых по меньшей мере одна предназначена для контрольного стандарта, необходимого для сравнения и позволяющего проводить

полуколичественную или количественную оценку концентрации присутствующего в образце аналита. В другой версии данного устройства вторичный специфически связывающийся партнер может быть иммобилизован в зоне обнаружения в виде множества полос, что приводит к титрованию меченого аналога аналита, способного с ним связываться. Количество вторичного специфически связывающегося партнера в каждой полосе рассчитывается таким образом, чтобы число зон, в которых связался аналог аналита соответствовало его количеству и, следовательно, концентрации аналита в проверяемом образце. Это позволяет произвести полуколичественную оценку концентрации аналита. Обычно в этом варианте устройства полоса вторичного специфически связывающегося партнера, ближайшая на хроматографической среде к зоне первого специфически связывающегося партнера аналита, имеет наименьшую концентрацию вторичного специфически связывающегося партнера, а каждая последующая полоса - большую по сравнению с первой.

Если концентрация аналита была достаточно высокой для того, чтобы после насыщения первой полосы вторичного специфически связывающегося партнера меченым аналогом аналита последнего в несвязанном состоянии осталось еще достаточное количество, этот свободный меченый аналог аналита будет связываться во второй полосе хроматографической среды. Таким образом, в зоне обнаружения хроматографической среды будут видны две полосы. Порядок концентрации аналита будет поэтому соответствовать появлению одной, двух или трех полос в зоне обнаружения.

Ожидаемый порядок концентраций измеряемого аналита определяет концентрации, обуславливающие появление одной или более линий в зоне обнаружения. Например, в случае котинина - метаболита никотина, концентрация его в общей воде организма, составляющая 10 ppb может указывать на значительное пассивное вдыхание сигаретного дыма, 500 ppb может указывать на активного курильщика, а 10000 ppb - на очень сильного курильщика. Устройство для анализа в этом случае может быть организовано таким образом, что одна линия будет появляться в случае 10 ppb котинина, две линии - при 500 ppb и три линии - при 10000 ppb.

В процессе применения устройства восстанавливающая жидкость как и ранее наносится на аппликатор для перерастворения аналога аналита. После этого образец прикладывается к первому проводнику и ему позволяют переместиться до ограничительной линии. Обычно процесс хроматографии в первом направлении

занимает от 5 до 25 секунд, наиболее типично - 10 секунд. После этого второй противоблок накладывают на первый, так чтобы они располагались друг против друга. Первый и второй противоблоки накрывают крышкой. После инкубации продолжительностью от 30 секунд до 10 минут (обычно примерно 2 минуты) в зоне вторичного специфически связывающегося партнера, в случае присутствия в образце аналита, можно наблюдать окрашенную линию. Наиболее желательные для анализа объемы растворов образца и восстанавливающей жидкости были описаны ранее для первого варианта конструкции устройства для конкурентного иммуноанализа.

Устройство, пригодное для этого варианта конкурентного иммуноанализа изображено на фиг. 24. В хроматографическом устройстве 780 имеются первый противоблок 782, второй противоблок 784 и крышка 785. Второй противоблок 784 шарнирно прикреплен с помощью первой петли 788 к одной из сторон первого противоблока 782. Ко второй стороне первого противоблока 782 с помощью второй петли 790 шарнирно прикреплена крышка 786. Первый противоблок 732 содержит хроматографическую среду 792, имеющую первый конец 794 и второй конец 796. В хроматографической среде 792 имеется область иммобилизованного на ней первого специфически связывающегося партнера аналита 798 и не перекрывающаяся с ней область, а которой иммобилизован вторичный специфически связывающийся партнер 800. Первый противоблок 782 кроме этого включает первый проводник 802 в действующем контакте с первым концом 794 хроматографической среды 792 и второй проводник 804 в действующем контакте со вторым концом 796 хроматографической среды 792. На первом противоблоке 782 также имеется ограничительная линия 806, указывающая на тот момент, с которого первый 782 и второй 784 противоблоки должны быть установлены друг против друга с целью изменения направления потока жидкости во время проведения анализа на противоположное.

Второй противоблок 784 включает аппликатор 808, содержащий аналог аналита в форме, способной к перерастворению за счет добавления восстанавливающей жидкости. Второй противоблок 784 также включает абсорбер 810, отделенный от аппликатора 808, и отверстие 814. Когда первый 782 и второй 784 противоблоки установлены друг против друга, аппликатор 808 находится в действующем контакте со вторым проводником 804, а абсорбер 810 - в действующем контакте с первым проводником 802, что позволяет изменить направление потока жидкости на противоположное. В крышке 786 имеется отверстие 812, позволяющее наблюдать за частью хроматографической среды 792. Предпочтительно, чтобы через отверстие 812 можно было производить наблюдение за областью иммобилизации - вторичного специфически связывающегося партнера аналита 798. Второй противоблок 784 и крышка 786 также содержат сцепки 811 и 813. Устройство снабжено окружающей его по периметру прокладкой 815.

В. Трехблочное устройство с однонаправленным потоком, снабженное абсорбером

Следующее устройство, пригодное для осуществления этого варианта конкурентного иммуноанализа, изображено на фиг. 25. В этом устройстве имеется третий блок, содержащий абсорбер или блоттер, служащий для удаления жидкости с хроматографической среды и обоих проводников. Абсорбер располагается вдоль значительной части хроматографической среды, когда находится с ней в действующем контакте. В состав устройства для хроматографического анализа 820 входят первый противоблок 822, второй противоблок 824 и третий противоблок 826. Второй противоблок 824 шарнирно прикреплен с помощью первой петли 828 к одной из сторон первого противоблока 822. Третий противоблок 825 с помощью второй петли 830 шарнирно прикреплен к другой стороне первого противоблока 822. Первый противоблок 822 содержит хроматографическую среду 832, имеющую первый конец 834 и второй конец 836. В хроматографической среде имеются иммобилизованные на ней не перекрывающиеся области первого специфически связывающегося партнера аналита 840 и вторичного специфически связывающегося партнера 838. Первый противоблок 822 также включает первый проводник 842, служащий в качестве аппликатора, в действующем контакте с первым концом хроматографической среды 832 и второй проводник 844 в действующем контакте со вторым концом 836 хроматографической среды 832. На первом противоблоке 822 также имеется ограничительная линия, указывающая на момент установления первого и второго противоблоков 822 и 824 друг против друга.

Второй противоблок 824 включает второй аппликатор 950, содержащий аналог аналита. Обычно для перерастворения аналога аналита, находящегося во втором аппликаторе 850, во второй аппликатор 850 добавляют водную фазу. Второй противоблок 824, кроме этого, содержит первый абсорбер 848, отделенный от второго аппликатора 850. Когда первый 822 и второй 824 противоблоки установлены друг против друга, второй аппликатор 850 находится в действующем контакте с первым проводником 842, а первый абсорбер 848 - в действующем контакте со вторым проводником 844 для удаления жидкости. Отверстие 852 расположено за хроматографической средой и позволяет наблюдать с задней стороны устройства за частью хроматографической среды 832. Второй и третий противоблоки 824 и 826 содержат сцепки 849 и 853. Устройство 820 также включает прокладку 858.

В состав третьего противоблока 826 входит второй абсорбер 854, расположенный таким образом, что он приходит в действующий контакт со значительной областью хроматографической среды 832 в том случае, когда третий 826 и первый 822 противоблоки установлены друг против друга. За счет этого удаляется избыток жидкости с первого 842 и второго 844 проводников, а также и из хроматографической среды 832.

В процессе использования образец



наносится на первый проводник или аппликатор 842 и ему позволяют пройти через хроматографическую среду 832. Третий противоблок 826 помещают против первого 822 для приведения второго абсорбера 854 в прямой контакт с первым проводником или аппликатором 842 и с хроматографической средой 832 для отбора избытка жидкости во второй абсорбер 854. Затем устанавливают второй противоблок 824 и первый противоблок 822 друг против друга, тем самым приводя второй аппликатор 850, содержащий перерастворенный меченый аналог аналита, в контакт с проводником или аппликатором 842 у первого конца 834 хроматографической среды 832. Точно также первый абсорбер 848 приводят в контакт со вторым проводником 844 на втором конце хроматографической среды 832. Далее третьим противоблоком 826 накрывают как крышкой второй противоблок 824. Часть хроматографической среды оказывается видимой через отверстие 856, расположенное за хроматографической средой 832.

Обнаружение и/или определение аналита осуществляется тем же самым способом, как описано выше в разделе II(Б) для двунаправленного проточного устройства.

Г. Трехблочное устройство с двунаправленным потоком, использующее специфичность биотина

Другим вариантом конструкции хроматографического устройства в соответствии с настоящим изобретением является трехблочное двунаправленное проточное устройство, использующее специфичность биотин-авидинового взаимодействия.

Первый противоблок содержит хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы, как описано выше. На хроматографической среде находятся иммобилизованные там: (1) вещество, способное специфически связывать биотин, выбранное из группы, состоящей из авидина, стрептавидина, антибиотинового антитела и их производных; и (2) вторичный специфически связывающийся партнер. Последний способен специфически связываться с трехкомпонентным комплексом, в состав которого входят: (а) аналит; (б) элемент специфически связывающейся пары, лишенный специфической связывающей аффинности к аналиту и ковалентно сконъюгированный с аналитом; и (с) детектируемая метка, связанная с элементом специфически связывающейся пары. Этот трехкомпонентный комплекс располагается на третьем противоблоке так же, как указывалось выше.

Связанные компоненты иммобилизуют на хроматографической среде в отдельных дискретных неперекрывающихся областях, каждая из которых значительно меньше хроматографической среды. Вторичный специфически связывающийся партнер иммобилизован в первой дискретной области и расположен ближе к первому концу хроматографической среды, чем вещество, способное к связыванию биотина (названное здесь в общем случае как "авидин"), которое иммобилизовано во второй дискретной области.

Первый противоблок также содержит

первый проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды и второй проводник в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды.

Второй противоблок включает первый аппликатор, содержащий первого специфически связывающегося с аналитом партнера в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к аппликатору. Как показано выше, водная фаза может представлять собой либо сам образец (предпочтительно), либо первую восстанавливающую жидкость, после которой добавляется образец. Первый специфически связывающийся партнер не способен быть связанным вторичным специфически связывающимся партнером. Первый специфически связывающийся партнер сконъюгирован с биотином.

Способы связывания биотина с глобулярными белками, включая антитела, хорошо известны среди специалистов и описаны, например, в указанной работе [8]. Биотин может связываться с белком как реакционноспособный эфир либо напрямую, либо посредством введения спейсера, например  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты. Обычно реакционноспособными эфирами являются биотинил-п-нитрофениловый эфир, биотинил-N-оксисукцинимидный эфир и капроилимидобиотинил-N-оксисукцинимидный эфир, последний из которых обеспечивает спейсер между биотиновой составляющей и белком. Биотин может быть также активирован другими группами.

Третий противоблок включает: (1) второй аппликатор, содержащий трехкомпонентный комплекс, как описано выше, состоящий из аналита, элемента специфически связывающейся пары, лишенного аффинности к аналиту, и детектируемой метки, и (2) абсорбер, отделенный от первого аппликатора.

Установка первого и второго противоблоков указанного устройства друг против друга приводит к тому, что первый проводник располагается в действующем контакте с первым аппликатором таким образом, что содержимое первого аппликатора наносится на первый проводник и на первый конец хроматографической среды. В результате этого содержимое первого аппликатора мигрирует по меньшей мере через часть хроматографической среды. Установка первого и третьего противоблоков друг против друга заставляет второй аппликатор приходить в действующий контакт со вторым проводником для нанесения содержимого второго аппликатора на второй конец хроматографической среды, а также заставляет абсорбер приходить в действующий контакт с первым проводником для удаления жидкости с первого конца хроматографической среды и изменяет направление потока на противоположное.

Примером удобного сочетания антител для использования в этом варианте конструкции устройства для хроматографического анализа в случае теофиллина как аналита является сочетание биотинилированного мышиного моноклонального антитеофиллинового IgG в качестве биотинилированного первого специфически связывающегося партнера, антитела из козы против кроличьего IgG в



качестве иммобилизованного вторичного специфически связывающегося партнера и кроличьего IgG, лишенного антетеофиллиновой активности, как элемента специфически связывающейся пары трехкомпонентного комплекса.

Другим примером анализа, который может быть проанализирован с помощью устройства этой конструкции, является пенициллин с использованием при этом пенициллинсвязывающего белка (ПСБ) в качестве специфически связывающегося партнера и трехкомпонентного комплекса, включающего 7-аминоцефалоспоровую кислоту, ковалентно связанную с кроличьим IgG, меченным коллоидным золотом. Другие β-лактамы антибиотики могут быть проанализированы точно так же.

В процессе работы биотинилированный первый специфически связывающийся партнер на первом аппликаторе перерастворяется добавлением либо самого образца, либо первой восстанавливающей жидкости перед нанесением образца, как описывалось выше. Трехкомпонентный комплекс на втором аппликаторе перерастворяется с помощью второй восстанавливающей жидкости так же, как описывалось ранее в разделе II(A).

После периода инкубации, достаточного для связывания анализа, если он имеется в образце, с первым специфически связывающимся партнером, первый и второй противоблоки устанавливаются друг против друга для нанесения образца и перерастворенного первого специфически связывающегося партнера на первый проводник и затем на первый конец хроматографической среды. Образец и первый специфически связывающийся партнер мигрируют через хроматографическую среду и проходят две дискретные неперекрывающиеся области иммобилизованных в ней реагентов. Первый биотинилированный специфически связывающийся партнер связывается с компонентом, способным к связыванию биотина во второй дискретной области. В случае присутствия анализа в образце этот биотинилированный специфически связывающийся партнер оказывается связанным с твердым носителем через биотин-авидиновое взаимодействие, сам, в свою очередь, связывая анализ. В случае отсутствия анализа в образце он не связывается со связанным биотинилированным специфически связывающимся партнером.

После того как образец и перерастворенный первый специфически связывающийся партнер минуют вторую дискретную область, первый и второй противоблоки разделяют, а первый и третий противоблоки устанавливают друг против друга, изменяя направление потока на противоположное и прикладывая трехкомпонентный комплекс ко второму проводнику. Затем трехкомпонентный комплекс мигрирует через хроматографическую среду от второго ее конца в направлении к первому. Если анализ присутствовал в исследуемом образце, биотинилированный специфически связывающийся партнер, связанный с авидином во второй дискретной области, не

может взаимодействовать с анализом в трехкомпонентном комплексе, в результате чего трехкомпонентный комплекс достигает вторичного специфически связывающегося партнера. Далее вторичный специфически связывающийся партнер связывается с элементом специфически связывающейся пары трехкомпонентного комплекса, где и обнаруживается. Обычно третий противоблок устройства снабжен таким отверстием, что только дискретная область вторичного специфически связывающегося партнера, но не вторая дискретная область авидина на хроматографической среде видна через него в том случае, когда третий и первый противоблоки установлены друг против друга. Однако, если в образце не содержится анализ, трехкомпонентный комплекс связывается первым специфически связывающимся партнером, связанным с авидином и имеющим незанятый антигенсвязывающий сайт. Поэтому трехкомпонентный комплекс не достигает первой дискретной области, содержащей вторичного специфически связывающегося партнера, и не детектируется.

Устройство для хроматографического анализа, пригодное для проведения этого вида конкурентного иммуноанализа, изображено на фиг. 25. В устройстве для хроматографического анализа 860 имеются первый противоблок 862, второй противоблок 864 и третий противоблок 855. Второй противоблок 854 шарнирно прикреплен с помощью первой петли 858 к одной из сторон первого противоблока 852, а третий противоблок 866 шарнирно прикреплен к другой стороне первого противоблока 862 второй петлей 870. В состав первого противоблока 862 входит хроматографическая среда 872, имеющая первый 874 и второй 876 концы, с первым проводником 878 в действующем контакте с первым концом 874 хроматографической среды 872 и вторым проводником 880 в действующем контакте со вторым концом 876 хроматографической среды 872. На хроматографической среде 872 имеется первая дискретная область вторичного специфически связывающегося партнера 882 и вторая дискретная область авидина 884. Первая 882 и вторая 834 дискретные области не перекрываются, причем первая дискретная область 882 расположена ближе к первому концу 874 хроматографической среды 872. Во втором противоблоке 864 имеется первый аппликатор 886, содержащий первого специфически связывающегося партнера анализа в форме, способной к перерастворению. Третий противоблок 866 включает второй аппликатор 888, содержащий способный к перерастворению трехкомпонентный комплекс и абсорбер 890, отделенный от второго аппликатора 838. Во втором 864 и третьем 866 противоблоках также имеются отверстия 892 и 894 для наблюдения за частью хроматографической среды 872. Предпочтительно, чтобы отверстия 892 и 894 позволяли видеть первую дискретную зону 882, содержащую вторичного специфически связывающегося партнера, но не вторую дискретную зону 884 авидина. Второй и третий противоблоки 864 и 866 также включают сцепки 891 и 895; устройство 860 содержит, кроме этого, прокладку 896.

В результате установки первого 862 и второго 864 противоблоков друг против друга первый аппликатор 886 приходит в действующий контакт с первым проводником 878, обеспечивая начало потока через хроматографическую среду 872. Впоследствии в результате установки первого 862 и третьего 866 противоблоков друг против друга второй аппликатор 888 приходит в действующий контакт со вторым проводником 880, а абсорбер 890 - в действующий контакт с первым проводником 878, изменяя на противоположное направление потока в хроматографической среде 872.

В одной из разновидностей этой конструкции устройства зона обнаружения может включать две или более полосы вторичного специфически связывающегося партнера, как описывалось ранее в разделе II(Б). С помощью этого можно оттитровать количество меченого трехкомпонентного комплекса, доступное для связывания и выражающееся в различном числе окрашенных полос в зоне обнаружения, которое соответствует количеству аналита в измеряемом образце.

Д. Двублочное устройство для конкурентного ингибиторного иммуноанализа

Еще один вариант конструкции устройства для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением может быть применен для проведения конкурентных иммуноанализов. С помощью такого устройства получается положительная индикация концентрации аналита в виде детектируемого сигнала в случае наличия аналита в измеряемом образце.

Этот вариант конструкции представляет собой двублочное устройство, использующее поток в одном направлении. Первый противоблок устройства включает хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы. На хроматографической среде иммобилизованы: (1) аналог аналита, способный связываться со специфически связывающимся партнером аналита; и (2) вторичный специфически связывающийся партнер, способный связываться с элементом специфически связывающейся пары, обладающим аффинностью к аналиту, сам, при этом, лишенный такой аффинности. Эти компоненты расположены на хроматографической среде в виде отдельных дискретных и неперекрывающихся областей.

Аналог аналита находится ближе к первому концу хроматографической среды, чем вторичный специфически связывающийся партнер. Аналог аналита представляет собой аналит, ковалентно связанный с молекулой белка, такой как неспецифический иммуноглобулин, которая может быть присоединена к хроматографической среде. Молекула белка не должна иметь аффинности к аналиту или к специфически связывающемуся партнеру аналита.

Вторичный специфически связывающийся партнер так же, как описывалось выше, избирательно связывает специфически связывающегося партнера аналита благодаря наличию видо-специфических детерминант. Взаимодействие между вторичным специфически связывающимся партнером и специфически связывающимся партнером аналита не затрагивает антиген-связывающих

сайтов последнего.

Первый противоблок также включает проводник в действующем контакте с первым концом хроматографической среды. Предпочтительно, чтобы на первом противоблоке, кроме этого, имелся абсорбер в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды.

Второй противоблок включает аппликатор, содержащий специфически связывающегося партнера аналита, меченного детектируемой меткой. Предпочтительной детектируемой меткой является визуально детектируемая метка, такая как соль металла. В одном из альтернативных вариантов второй противоблок может дополнительно содержать отделенный от аппликатора абсорбер, если первый противоблок его не содержит. Желательным является наличие во втором противоблоке отверстия, позволяющего наблюдать за частью хроматографической среды. Предпочтительно, чтобы этой частью являлась зона вторичного специфически связывающегося партнера, но не зона аналога аналита.

В процессе работы анализируемый образец помещают на аппликатор, что приводит к перерастворению меченого специфически связывающегося партнера. Обычно образец инкубируют со специфически связывающимся партнером от 1 до 3 минут, однако этот период времени может быть увеличен, если необходимо повысить чувствительность.

После этого первый и второй противоблоки устанавливают друг против друга, что обуславливает приложение содержимого аппликатора к проводнику и затем к первому концу хроматографической среды. Аналит, присутствующий в позитивном образце, занимает аналит-связывающие сайты меченого специфически связывающегося партнера, в результате чего последний не связывается с аналогом аналита, иммобилизованным на хроматографической среде. Вместо этого меченый специфически связывающийся партнер поступает в область вторичного специфически связывающегося партнера, в которой связывается, образуя детектируемую линию, дающую позитивную индикацию присутствия аналита.

В отсутствие аналита в анализируемом образце весь меченый специфически связывающийся партнер аналита связывается аналогом аналита и не достигает вторичного специфически связывающегося партнера. Количество реагентов могут быть подобраны таким образом, что концентрация аналита, необходимая для получения позитивного ответа, может отвечать клиническим или фармакологическим требованиям.

Устройство, пригодное для проведения этого варианта конкурентного иммуноанализа, изображено на фиг. 27. В устройстве 900 имеется первый противоблок 902 и второй противоблок 904, шарнирно соединенные друг с другом с помощью петли 906. В состав первого противоблока 902 входит хроматографическая среда 908, имеющая первый 910 и второй 912 концы. Хроматографическая среда 908 содержит иммобилизованные на ней неперекрывающиеся области аналога

аналита 914 и вторичного специфически связывающегося партнера 916. В первом противоблоке 902 также имеются проводник 918 в действующем контакте с первым концом 910 хроматографической среды 908 и абсорбер 920 в действующем контакте со вторым концом 912 хроматографической среды 908.

Второй противоблок 904 включает аппликатор 922, содержащий меченого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению благодаря добавлению образца. Второй противоблок 904 также содержит отверстие 924, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды 908. Предпочтительно, чтобы отверстие 924 позволяло бы наблюдать за областью вторичного специфически связывающегося партнера 916, но не за областью аналога аналита 914. В первом и втором противоблоках, кроме этого, имеются сцепки 923 и 925 и прокладка 926, как описано ранее для двублочных устройств. В другой версии этого варианта устройства зона обнаружения может включать две или более полосы специфически связывающегося партнера для получения полуколичественной оценки концентрации аналита в исследуемом образце, как было описано ранее в разделе II(Б). За счет этого количество меченого специфически связывающегося партнера, способное быть связанным, оттитровывается, указывая количество аналита в исследуемом образце по числу окрашенных полос в зоне обнаружения.

### III. АНАЛИТЫ И АНТИТЕЛА, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В АНАЛИТИЧЕСКИХ УСТРОЙСТВАХ

Аналиты, которые могут быть обнаружены с помощью устройства для анализа в соответствии с настоящим изобретением включают антигены, гаптены и антитела. К таким антигенам относятся гемоглобин, антигены *Streptococcus A* и *B*, антигены, присущие простейшему паразиту *Giardia a* и вирусные антигены, включающие антигены, характерные для HIV, и Австралийский антиген, присущий вирусам гепатита. Антитела, которые могут быть проанализированы, включают антитела к бактериям, таким как *Helicobacter pylori*, и к вирусам, включая HIV. К регистрируемым гаптенам относятся как перечисленные ранее в разделе III, так и другие гаптены, к которым могут быть получены антитела достаточной специфичности.

В случае, когда аналитом является антиген или гаптен и используется сэндвич процедура, первый и второй специфически связывающиеся партнеры преимущественно являются антителами. Во многих вариантах применения желательно, чтобы первый и второй специфически связывающиеся партнеры были антителами на различные эпитопы аналита, но это не является обязательным. Антитела могут быть как поликлональными, так и моноклональными и принадлежать к одному из видов IgG, IgM или IgA. Во многих случаях предпочтение отдается поликлональным антителам, поскольку их природная изменчивость может позволить произвести более аккуратное обнаружение в тех системах, где имеется или

может иметься антигенный полиморфизм.

Когда аналитом является гаптен и используется сэндвич процедура, строго предпочтительно, чтобы первый и второй специфически связывающиеся партнеры были антителами на различные эпитопы; в противном случае, может иметь место набор нежелательных конкурентных реакций, способных препятствовать связыванию комплекса меченого специфически связывающегося партнера и аналита с иммобилизованным вторым специфически связывающимся партнером. Известно, что не все гаптены достаточно велики для того, чтобы содержать более одного эпитопа; однако некоторые гаптены, хотя и недостаточны по размерам для индукции антител вследствие их инъекции, тем не менее достаточно велики для того, чтобы содержась более одного эпитопа. В тех случаях, когда не удается получить антитела на более чем один эпитоп гаптена, предпочтение следует отдавать процедуре конкурентного анализа.

Когда аналитом является антитело и применяется сэндвич процедура анализа, первым специфически связывающимся партнером обычно является меченое антитело, связывающееся с аналитом на основе видовой, классовой или подклассовой (изотипической) специфичности. Крайне желательно чтобы первый специфически связывающийся партнер антитело-аналита связывался во избежание перекреста с его постоянной областью. Вторым специфически связывающимся партнером в случае антитела в качестве аналита, является преимущественно антиген или гаптен, к которому антитело-аналит имеет специфичность.

Иногда бывает желательным применить не прямое мечение. Например, при тестировании на антиген *Giardia* можно использовать IgM антитело, которое трудно пометить непосредственно. В таком случае может быть помечен вторичный специфически связывающийся партнер, специфичный к подвижному первому специфически связывающемуся партнеру. Обычно меченый вторичный специфически связывающийся партнер связывается с антителом, являющимся первым специфически связывающимся партнером на основе видовой, классовой или подклассовой специфичности.

В качестве альтернативы использования вторичного специфически связывающегося партнера первый специфически связывающийся партнер может быть сконъюгирован с биотином и применена метка, присоединенная к авидину.

Эти взаимосвязи между аналитами, специфически связывающимися партнерами и метками, применяемыми для проведения сэндвич иммуноанализов, суммированы ниже в Таблице 1.

Взаимосвязи между аналитами, специфически связывающимися партнерами, метками и другими участниками реакционных схем для конкурентных иммуноанализов приведены ниже в таблице 11.

#### IV. Наборы для анализа

Другим аспектом настоящего изобретения являются наборы для анализа, которые могут быть использованы для обнаружения

индивидуальных аналитов. Наборы для анализа содержат в отдельных контейнерах:

(1) устройство для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением;

(2) любые необходимые реагенты, требующиеся для обработки или экстракции образцов; и

(3) возможно, в тех случаях когда само устройство для анализа не содержит меченого специфически связывающегося партнера аналита в форме, способной к перерастворению, требуемого специфически связывающегося партнера.

Компоненты, необходимые в (2) и (3) упакованы отдельно и могут находиться в жидкой или твердой форме (лиофилизированном, кристаллическом, осажденном или агрегированном состоянии). Во втором случае они перерастворяются пользователем обычно с помощью дистиллированной или очищенной воды, физиологического раствора или раствора буфера.

В некоторых случаях контрольные наборы могут также включать восстанавливающую жидкость, необходимую для перерастворения реагентов устройства: специфически связывающегося партнера или аналога аналита. Специальные примеры с изложением работы каждого типа устройства были описаны ранее.

Возможны и другие варианты устройств для анализа в соответствии с настоящим изобретением. Например, любое из описанных двублочных устройств может иметь крышку, шарнирно прикрепленную к одному из противоблоков. В крышке может иметься отверстие, позволяющее наблюдать по меньшей мере за частью хроматографической среды.

Представленные ниже примеры поясняют настоящее изобретение. Примеры приведены только в иллюстративных целях и ни в коей мере не должны истолковываться как ограничивающие сферу изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

##### Пример 1

Конструкция устройства для обнаружения стрептококкового антигена

Устройство разработано для обнаружения антигена *Streptococcus A* с использованием меченых антител к этому антигену. Конструкция устройства в основных чертах изображена на фиг. 28.

Фиг. 28 демонстрирует устройство для хроматографического анализа 940 в соответствии с настоящим изобретением с первым противоблоком 942, вторым противоблоком 944, шарнирно прикрепленным к первому противоблоку 942 и крышкой 946, шарнирно прикрепленной ко второму противоблоку 944. Первый противоблок 942 включает хроматографическую среду 948. В состав второго противоблока 944 входит лента 952, растянутая вдоль него и удерживающая на месте за счет натяжения гнездо 950, имеющее форму капли. Каплеобразное гнездо 950 формирует углубление, когда удерживается на месте за счет натяжения ленты 952. Первый противоблок 942 содержит первое окно 954, а крышка 946 - второе окно 956.

Противоблоки изготовлены из жесткого,

непроницаемого для воды пластика, такого, как поликарбонат. Размеры первого, второго противоблоков и крышки составляют примерно 7,62 см (3 дюйма) в длину; ширина первого противоблока примерно 5,71 см (2,25 дюйма), второго противоблока и крышки - 6,04 см (2,375 дюйма). Ко второму противоблоку прикреплено гнездо из губчатой резины, в котором проделано каплеобразное углубление, способное вмещать тампон или другое приспособление, содержащее образец. Тампон закрепляется с помощью ленты, дополнительно введенной в состав второго противоблока и располагающейся вдоль углубления.

В качестве хроматографической среды использована полоска нитроцеллюлозы с 8 мкм порами, длиной 1,27 см (0,5 дюйма) (MSI, Westborough, Mass.), зафиксированная на пластиковой подложке с помощью двусторонней ленты (3M, Minneapolis Minnesota). Проводником и абсорбером были полоски целлюлозы (Ahlsstrom Filtration, Holly Springs, Pennsylvania), длиной 1,35 см (17/32 дюйма) для абсорбера, который был градации 939 по Ahlsstrom, и длиной 0,635 см (0,25 дюйма) для проводника, градации 1281. Материал детекторной аппликаторной подложки был также градации 1281, ширина ее составляла 0,95 см (0,375 дюйма). Детекторная аппликаторная подложка немного перекрывалась с проводником, который в свою очередь, перекрывался с первым концом хроматографической среды. Второй конец хроматографической среды немного перекрывался с абсорбером.

Требуемые реагенты сначала были введены в хроматографическую среду и детекторную аппликаторную подложку, после чего устройство было собрано с использованием двусторонней ленты для соединения элементов конструкции.

Зона обнаружения включала кроличье анти-*Streptococcus A* антитело в концентрации 2 мг/мл в 0,001 моль/л фосфатном буфере, pH 7,2. Контрольная зона содержала козы антитела против кроличьего IgG в той же концентрации и в том же буферном растворе. Растворы антител были нанесены на подходящие области хроматографической среды и высушены при 37,8°C (100° F) в атмосфере низкой влажности. Хроматографическая среда была увлажнена избытком блокирующего раствора (Блокирующий раствор для ELISA, Boehringer Mannheim, Mannheim, Германия), разбавленным в отношении 1:10 дистиллированной водой, содержащей 0,2% твин 20, и опять высушена при 37,8 °C (100 ° F).

Детекторная аппликаторная подложка содержала кроличье анти-*Streptococcus* антитело, меченное 40 нм частицами коллоидного золота. Для нанесения меченого антитела на детекторную аппликаторную подложку оно было разбавлено в отношении 1:1,5 с помощью раствора ДБН (1,5 моль/л трис-HCl, pH 7,4, 1% (о/о) твин 20, 0,4% (о/о) бридж 35, 0,02% (в/о) азида натрия, 3 мг/мл кроличьего IgG). Для проведения одного измерения 15 мкл разбавленного раствора меченого антитела наносили на детекторную аппликаторную подложку. Детекторную аппликаторную подложку высушивали в течение 30 минут при 37,8°C (100° F).

## Пример 2

Обнаружение стрептококкового антигена с помощью устройства, описанного в примере 1

Устройство, описанное в примере 1, использовали для обнаружения *Streptococcus A* антигена. Сплетенный из дакрона тампон, в который было добавлено различное количество бактерий стрептококка типа A, был введен в углубление для образца. К тампону добавляли три капли реагента для экстракции A (0,25% уксусная кислота, 5% твин 20) и три капли реагента для экстракции B (2 моль/л нитрита натрия, 5% твин 20), перемешивали, плавно вращая тампон и инкубировали в течение одной минуты. После этого устройство закрывали, так что первый и второй противоблоки приходили в контакт и первый противоблок накрывали крышкой. Результат считывали после инкубационного периода продолжительностью от 2 минут до 5 минут. Развитие розово-красной полосы в зоне обнаружения хроматографической среды указывало на наличие антигена *Streptococcus A*.

Устройство, приведенное в примере 1, способно фиксировать  $1 \cdot 10^5$  клеток стрептококка A после 2-минутной инкубации и  $5 \cdot 10^4$  клеток стрептококка A после 5-минутной инкубации. Для сравнения, устройство для иммуноанализа Concise<sup>TM</sup> фирмы Hybritech (La Jolla, California) было способно зафиксировать  $1 \cdot 10^5$  клеток стрептококка A только после 5 минут инкубации и было не способно фиксировать  $5 \cdot 10^4$  клеток даже после 20-минутной инкубации. Аналогично, устройство для иммуноанализа Smart<sup>TM</sup> фирмы New Horizons было в состоянии детектировать  $1 \cdot 10^5$  клеток стрептококка A только после 7 минут инкубации и давало неоднозначный результат после инкубации такой же продолжительности с  $5 \cdot 10^4$  клетками в пробе.

## Пример 3

Конкурентный иммуноанализ на теофиллины с использованием трехблочного устройства для анализа

Было разработано устройство для конкурентного иммуноанализа на бронхолитическое средство теофиллин. 12-микронную нитроцеллюлозную мембрану производства Schleicher and Schuell (Keene, New Hampshire) закрепляли с помощью двустороннего связующего материала в блоках размером 6,35 см (2,5 дюйма) на 1,75 см (11/16 дюйма). Аналог теофиллина, способный к гидрофобному связыванию с нитроцеллюлозой, готовили посредством ковалентного связывания теофиллина с обычным кроличьим иммуноглобулином G, используя следующую процедуру: раствор 8-(3-карбоксипропил)-1,3-диметилксантина (18 мг, 0,068 мМ) в 2 мл тетрагидрофурана и 1 мл диметилформамида обрабатывали N-гидроксисукцинимидом (17 мг, 0,15 мМ) и дициклогексилкарбодиимидом (27 мг, 0,13 мМ). После выдерживания в течение ночи при комнатной температуре реакционную смесь помещали в холодильник на два часа и затем фильтровали через стеклянное волокно. Кристаллы из реакционной смеси промывали тетрагидрофураном и растворы объединяли. Растворители удаляли под вакуумом и сухой остаток промывали 3-4 мл диэтилового эфира для удаления избытка карбодиимида.

Промытый таким образом остаток промывали затем в 2 мл диметилформамида. Нормальный кроличий IgG (3,75 мл раствора в концентрации 13,7 мг/мл) разбавляли до объема 10 мл водой. Активированный N-гидроксисукцинимидный эфир медленно добавляли к раствору иммуноглобулина G, после чего к раствору добавляли 10 мкл триэтиламина. В результате реакционная смесь содержала примерно 130 эквивалентов активного эфира на моль белка. Реакционную смесь оставляли после этого на три дня в холодильнике.

Десять мкл раствора конъюгата теофиллина с кроличьим IgG (1 мг/мл в 0,05 М фосфатном буфере) одним и тем же образом наносили с помощью шприца Гамильтона вдоль верхнего края мембран длиной 6,35 см (2,5 дюймовых). Мембраны высушивали в дегидраторе в течение 15 минут, затем погружали в белковый блокирующий раствор (0,2% обезжиренное молоко, 0,2% твин 20) и опять высушивали в течение 15 минут. Линия нанесения конъюгата теофиллина с кроличьим иммуноглобулином G указывала на верх мембраны. Полоску из Ahlstrom Cytosep 799-13 (Ahlstrom Filtration) 0,635 см (1/4 дюйма) прилепляли поверх мембраны, чтобы она выполняла роль проводящей области. Вторую проводящую полосу мембраны из Ahlstrom 992 прикрепляли к нижней стороне мембраны. Мембранные блоки затем разрезали на полоски по 0,635 см (1/4 дюйма) и хранили в сухом виде.

Для получения подложки для реагента вырезали квадраты размерами 0,635•0,635 см (1/4 дюйма) из Lipore (стеклянный волокнистый фильтр градации 9254 производства фирмы Lydall Technical Papers, Rochester, New Hampshire). На подложку для первого реагента наносили 40 мкл антитеофиллинового антитела (мышинное моноклональное, производства O. E. M. Concepts, Toms River, New Jersey) в концентрации 180 мкг/мл в буфере для высушивания и стабилизации (0,5 М трис-HCl, pH 7,2, 0,1% твин 20, 0,1% бридж 35, 1,0% бычий сывороточный альбумин) и высушивали в течение двух часов. На подложку для второго реагента было нанесено 20 мкл рабочего разведения антитеофиллинового золотого конъюгата (E-Y Laboratories) с моноклональным антитеофиллиновым антителом; подложку для второго реагента также высушивали в течение двух часов.

Полоски мембран были надежно закреплены в картонном корпусе так, чтобы линия теофиллин-кроличий IgG была видна через окошки в корпусе, как показано на фиг. 23. Подложку для первого реагента, содержащую антитеофиллиновое антитело, помещали в верхнюю область левой трети корпуса так, чтобы в закрытом состоянии устройства она контактировала бы с верхней проводящей областью мембраны аналогично аппликатору 764 на фиг. 23. Подложку для второго реагента, содержащую антитеофиллиновый золотой конъюгат, помещали в нижнюю область правой трети корпуса, за счет чего она могла контактировать с нижней проводящей областью мембраны аналогично аппликатору 768 на фиг. 23. Квадраты размером 2•2 см из Ahlstrom 270 использовались в качестве

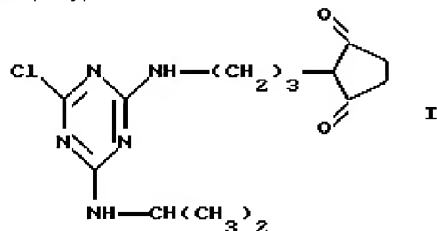
абсорбирующей подложки и помещались в верхнюю область правой трети корпуса так, чтобы, когда правая треть корпуса накладывалась на центральную, абсорбирующая подложка приходила бы в контакт с верхней проводящей областью.

#### Пример 4

Конъюгат атразина с иммуноглобулином G кролика и козы

Для того чтобы продемонстрировать возможность конъюгации гаптенa с иммуноглобулином G, были приготовлены конъюгаты атразина с кроличьим и козым иммуноглобулином G. Для получения конъюгата с кроличьим иммуноглобулином G, кроличий IgG (34,1 мг в 5 мл фосфатного буферного раствора) был обработан 12 мг тиоацетилсукцинового ангидрида и 20 мкл триэтиламина (приблизительно 300 эквивалентов ангидрида на моль белка). Раствор оставляли на ночь в холодильнике и после этого диализовали против одной смены воды объемом 2 литра и четырех смен фосфатного буферного раствора такого же объема. Готовили раствор солянокислого гидроксилamina концентрацией 63 мг/мл. К приготовленному как указано выше кроличьему IgG в 8 мл фосфатного буферного раствора добавляли 52 мкл раствора гидроксилamina (3,3 мг, приблизительно 200 эквивалентов). Раствор оставляли на 45 минут при комнатной температуре.

Производное атразина (формула I ниже), в котором терминальная метильная группа заместителя при атоме азота активирована, было растворено в ацетонитриле в концентрации 19,7 мг/мл. Часть этого раствора (200 экв., 16,6 мг, 844 мкл) была добавлена к раствору кроличьего IgG-тиола. Раствор оставляли на ночь при комнатной температуре.



Подобная же процедура была использована для присоединения атразина к иммуноглобулину G козы. IgG козы (7,8 мг в 1,5 мл фосфатного буферного раствора) был обработан 8 мг тиоацетилсукцинового ангидрида и 10 мкл триэтиламина. Раствор оставляли на ночь в холодильнике и затем диализовали так же, как в случае кроличьего IgG. Отдиализованный раствор IgG козы обрабатывали 10 мл раствора гидроксилamina (0,75 мг, приблизительно 200 экв.). Раствор оставляли на 45 минут при комнатной температуре. Вторую порцию производного атразина (200 экв., 3,8 мг, 190 мкл) добавляли к раствору IgG-тиола козы и проводили реакцию в течение ночи. ELISA, в котором конъюгат IgG козы с атразином был иммобилизован на полистирольных плашках для микротитрования, показал, что реакция была успешной.

#### Пример 5

Устройство для конкурентного анализа, использующее меченый трехкомпонентный конъюгат

Было сконструировано устройство для проведения конкурентного иммуноанализа для обнаружения теофиллина в соответствии с настоящим изобретением, использующее меченый трехкомпонентный конъюгат. Оно представляло собой двублочное устройство с крышкой, схожее с устройством, изображенным выше на фиг. 24. Расположение элементов устройства, описанное здесь далее, относится к устройству, ориентированному горизонтально, как показано на том рисунке.

Нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 12 мкм) (Schleicher and Schuell) надежно закрепляли с помощью двухсторонней связующей ленты (3M) в виде блоков размером 6,35 см (2,5 дюйма) • 1,75 см (11/16 дюйма). Прозрачный пластиковый блок уже был прикреплен к оборотной стороне связующей ленты. Моноклональное антитеофиллиновое антитело (см. Пример 4) в фосфатном буферном растворе (10 мкл) было равномерно нанесено с помощью шприца Гамильтона в верхнюю область нитроцеллюлозной мембраны, общей длиной 6,35 см (2,5 дюйма), на расстоянии 0,79 см (5/16 дюйма) от обозначенного верха. Антитела козы на кроличий иммуноглобулин были получены от Pel-Freez Biologicals (Rogers, Arkansas). Очищенный IgG получали осаждением плазмы каприловой кислотой и сульфатом аммония. Десять мкл очищенных козьих антител на кроличий IgG (3,5 мг/мл в фосфатном буферном растворе) наносили выше первой линии антитеофиллиновых антител на расстоянии 0,32 см (1/8 дюйма) от верха. Мембраны сушили в дегидраторе с циркуляцией в течение 10 минут, затем погружали в блокирующий раствор (см. Пример 4) и высушивали вторично в течение 15 минут. Полоску из Ahlstrom 1281 (Ahlstrom Filtration) размером 0,635 см (1/4 дюйма) прикрепляли к верхней части мембраны в качестве проводящей области. Вторую проводящую полоску, Ahlstrom 992, надежно прикрепляли к нижней области. После этого мембранные блоки разрезали на полоски размером 0,635 см (1/4 дюйма).

Подложки для реагентов размером 0,635 см • 0,635 см (1/4 • 1/4 дюйма) вырезали из Ahlstrom 1281. На каждый такой квадрат наносили предварительно разбавленный комплекс теофиллинкроличий IgG-золото (E. Y. Laboratories). Квадраты сушили в течение 2 часов. Мембранные полоски надежно закрепляли в корпусе таким образом, что через окна оказывалась видимой только верхняя линия, содержащая козы антитела на кроличий IgG. Подложку для реагента размещали в нижней области левой трети корпуса так, чтобы когда последнюю накладывали на центральную панель, подложка для реагента приходила бы в контакт с нижней проводящей областью на мембране. Квадрат размером 2 см • 2 см из Ahlstrom 270 помещали в верхнюю область левой трети корпуса точно над окном, где он служил в качестве абсорбирующей подложки. Он располагался таким образом, чтобы контактировать с верхней проводящей областью мембраны в закрытом устройстве.

#### Пример 6

Двублочное устройство для конкурентного ингибиторного иммуноанализа

Сконструировано двублочное устройство,



использующее нитроцеллюлозные мембранные полоски, связующее и подложки для реагента, такие же, как в Примере 4 (см. выше). Устройство аналогично изображенному выше на фиг. 27. Расположение элементов устройства, описанное здесь далее, относится к устройству, ориентированному горизонтально, как показано на рисунке. На нитроцеллюлозной хроматографической мембране иммобилизованы две линии. Первая содержала 10 мкл аффинно очищенного антитела из козы против мышиного IgG (O. E. M. Concepts), разбавленного буферным раствором для сушки (0,01 М фосфат, 3,0% сахарозы, 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 0,5% твин-20, 0,05% азида натрия (pH 7,4)). Вторая линия содержала 10 мкл конъюгата теофиллина с кроличьим IgG такого же, как в Примере 4, в 0,05 М фосфатном буферном растворе в концентрации 1мкг/мл. Мембраны были высушены в дегидрататоре, пропитаны белковым блокирующим раствором (0,1 М трис-HCl, 0,1% БСА, pH 7,4), затем снова высушены. 20 мкл рабочего разведения мышиного моноклонального антитеофиллинового антитела (O.E. M. Concepts), сконъюгированного с коллоидальным золотом (E-Y Laboratories), наносили в буферном растворе для сушки на аппликатор второго противоблока и высушивали в течение 2 часов.

Для анализа теофиллин (Aldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsin) растворяли в метаноле с образованием концентрированного раствора и последующие его разведения делали в фосфатном буферном растворе или плазме. Образцы (30 мкл) добавляли в аппликатор второго противоблока для перерастворения конъюгата антитеофиллин-золото. После одномоментной инкубации два противоблока устанавливали друг против друга так, что аппликатор приходил в контакт с нижним проводником анализируемой полоски. В течение 2-5 минут визуальная обнаруживаемая линия, единственная линия, видимая через отверстие в корпусе, появлялась в зоне антитела из козы против мышиного IgG. Обнаруживаемые концентрации теофиллина могут достигать до 1 ppb (частей на миллиард).

Пример 7

Двублочное устройство для конкурентного анализа с полуколичественными результатами

Сконструировано двублочное устройство для конкурентного анализа атразина согласно Примеру 6, отличающееся тем, что зона обнаружения содержит три линии аффинно очищенного антитела из козы против мышиного IgG (GAM) (O.E.M. Concepts) в дополнение к линии конъюгата атразин-IgG козы (Пример 6). Линия на хроматографической среде, ближайшая к конъюгату атразин-IgG козы, содержала наиболее разбавленное антитело в концентрации 0,5 мг/мл; остальные две линии содержали более концентрированное антитело, в концентрации 1 мг/мл каждая. Мышиное моноклональное антиатразиновое антитело было получено от Agri-Diagnostics (Cinnaminson, N. J. ). Буферный раствор для высушивания и стабилизации конъюгата антиатразин-золото, нанесенный на второй

противоблок, представлял собой раствор 4% сахарозы, 10 mM фосфат, 0,5% бычий сывороточный альбумин, 0,25% твин- 20, 0,05% азид натрия, pH 7,4.

Для проведения анализа атразин (Supelco, Inc., Bellefonte, Pennsylvania) растворяли в качестве стандарта в метаноле, последующие разведения для использования в качестве рабочих стандартов проводили в деионизованной воде. Тридцать мкл образца наносили на аппликатор второго противоблока. После одной минуты инкубации два противоблока устанавливали друг против друга для нанесения образца и перерастворенного комплекса антиатразин-золото на хроматографическую среду. В течение трех минут концентрация атразина в образце от 1 до 10 частей на миллиард давала одну линию на хроматографической среде; концентрация от 11 до 100 частей на миллиард - две линии, и концентрация от 101 до 1000 частей на миллиард - три линии.

Устройства для хроматографического анализа согласно настоящему изобретению имеют преимущество благодаря конструкции, обеспечивающей возможность противопоставления элементов (противоблоков). Использование противоблоков очень многогранно, так как предусматривает разнообразную последовательность осуществления реакций. Это оказывается возможным благодаря тому, что обеспечивается доставка реагентов к точно определенным областям тест-полоски или другого реакционноспособного компонента устройства. Использование противоблоков также обеспечивает оптимальное выполнение процесса анализа с минимальным расходом реагентов, благодаря тому, что содержание реагентов не уменьшается вследствие изолирования их в мертвом объеме аппаратуры. Наконец, использование противоблоков обеспечивает оптимальное удержание потенциально зараженных образцов крови, например, содержащих вирусы СПИДа или гепатита.

Другое преимущество аналитических устройств в соответствии с настоящим изобретением заключается в их способности использовать давление для перемещения жидкости с одного противоблока на другой и через хроматографическую среду и в способности контролировать его значение с тем, чтобы обеспечить оптимальное давления в каждом выполняемом анализе. Это ускоряет процесс анализа и допускает выполнение таких операций, как экстракция внутри самого аналитического устройства. При этом также уменьшается мертвый объем, занимаемый реагентами, остающимися в блоках, делая возможным использование меньших по объему образцов и меньших количеств таких дорогих и трудно очищаемых реагентов, как меченые антитела.

Кроме того, использование устройств для хроматографического анализа в соответствии с настоящим изобретением делает возможным быстрое и точное обнаружение клинически важных анализатов, таких как Streptococcus A и B антигены, гемоглобин для определения скрытой в фекалиях крови и антитело к Helicobacter pylori, а также клинически важных гаптенов. Конструкция этих устройств позволяет более равномерно

нанести образцы на хроматографическую среду и уменьшить помеху, которая, в противном случае, могла быть внесена частицами или окраской образцов. Использование коллоидных металлических меток в способной к перерастворению форме обеспечивает экстремально быструю кинетику их введения и способствует достаточно полному образованию бинарных комплексов аналит-метка до нанесения образца на хроматографическую среду. Это помогает отделению загрязнений и улучшает выполнение анализа. Кроме этого, конструкция и расположение корпуса устройства способствуют проведению анализа посредством обеспечения удаления избытка иммуноглобулинсодержащего образца, что, в противном случае, могло бы создать помеху.

Экстракция таких образцов, как кровь, мокрота или экскременты, может быть осуществлена прямо в устройстве, при этом снижается количество наносимого загрязненного материала и уменьшается вероятность случайной инфекции врачей, лаборантов или другого персонала таким зараженным материалом. Вдобавок, с помощью этих устройств можно осуществлять двунаправленную хроматографию для дальнейшего увеличения точности и уменьшения влияния помех на анализ. Методы исследования, в которых используются устройства, в соответствии с настоящим изобретением обладают широким динамическим диапазоном и в значительной степени защищены от ошибочных результатов, которые могут встречаться в случае применения других методов анализа при высокой концентрации аналита.

Хотя настоящее изобретение было описано достаточно детально, со ссылкой на определенные предпочтительные его варианты, возможны и другие варианты и конструктивные воплощения. Эти варианты предполагают другие способы сборки двух- или трехблочных устройств, действующих по основным описанным здесь принципам и использующих любой из них, а именно: (а) экстракцию образцов *in situ*; (b) перерастворение меченого специфически связывающегося партнера и быстрое связывание с аналитом; и (с) расположение хроматографической среды и абсорбера с целью удаления избытка образца, мешающего, в противном случае, проведению анализа. Эти варианты включают устройства, предназначенные для проведения как конкурентных иммуноанализов, так и сэндвич иммуноанализов в различных их воплощениях. В частности, устройства в соответствии с настоящим изобретением могут быть приспособлены для использования радиального или периферического потока через хроматографическую среду вместо линейного. Кроме того настоящее изобретение включает варианты, в которых два или три блока устройства не удерживаются постоянно в фиксированном положении, а могут разделяться и соединяться для выполнения анализа, например, за счет электрических или магнитных сил или посредством использования отделяемого зажима, имеющего структуру типа крючок-петля,

такого как Velcro. На основании вышеизложенного, сфера применения изобретения определяется следующей формулой.

#### Литература

1. Singer et al. Am. J. Med. 22:888-892(1956).
2. Патент США N 4,168,146.
3. Патент США N 4,366,241.
4. Патент США N 4,235,601.
5. Патент США N 4,442,204.
6. Buechler et al. U.S. Patent N 5,208,535.
7. J. DeMey. The Preparation and Use of Gold Probes. In: Immunocytochemistry: Modern Methods and Applications (J.M.Polak & S.VanNoorden, eds., Wright, Bristol, England, 1986), Ch. 8, pp.115-145.
8. P. Tijssen. "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays" (Elsevier, Amsterdam, 1985) pp. 279-296.

#### Формула изобретения:

1. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения аналита в образце, отличающееся тем, что оно содержит

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(II) первую детекторную аппликаторную подложку в действующем контакте с первым концом хроматографической среды, содержащую по меньшей мере один реагент для обнаружения аналита;

(III) проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первой детекторной аппликаторной подложкой и в непрямой контакт с первым концом хроматографической среды;

(IV) абсорбер для поглощения жидкости в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды;

(б) второй противоблок, включающий зону приготовления образца для введения исследуемого образца, прикрепляемый к первому противоблоку так, что первый и второй противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому;

причем первый и второй противоблоки сконструированы таким образом, что когда они не установлены друг против друга, образец может быть нанесен в зону приготовления образца на втором противоблоке, а в результате установки их друг против друга зона приготовления образца оказывается в контакте с проводником с целью нанесения исследуемого образца на указанный проводник для протекания через него и затем через первую детекторную аппликаторную подложку к первому концу хроматографической среды, чтобы произошло добавление к указанному образцу указанного реагента для обнаружения аналита; потоку от проводника через первую детекторную аппликаторную подложку к первому концу хроматографической среды способствует поглощение жидкости указанным абсорбером.

2. Устройство по п.1, отличающееся тем, что первая детекторная аппликаторная подложка на первом противоблоке содержит первый специфически связывающийся с аналитом партнер, меченный детектируемой меткой, в перерастворимой путем добавления

водной фазы к указанной первой детекторной аппликаторной подложке форме, и кроме того, хроматографическая среда включает зону обнаружения, площадь которой значительно меньше площади хроматографической среды, содержащую иммобилизованный в ней специфически связывающийся с аналитом партнер, посредством чего, если в образце присутствует аналит, в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий первый специфически связывающийся партнер, аналит и второй специфически связывающийся партнер.

3. Устройство по п.2, отличающееся тем, что второй противоблок включает, кроме того, вторую детекторную аппликаторную подложку в действующем контакте с зоной приготовления образца, содержащую второй специфически связывающийся с аналитом партнер в перерастворимой добавлении образца к зоне приготовления образца форме, который помечен детектируемой меткой, при этом вторая детекторная аппликаторная подложка располагается на втором противоблоке смежно с зоной приготовления образца так, что нанесение образца в зону приготовления образца перерастворяет второй специфически связывающийся партнер, вследствие чего зона приготовления образца содержит смесь образца и второго специфически связывающегося партнера.

4. Устройство по п. 3, отличающееся тем, что идентичные детектируемые метки являются визуально детектируемыми.

5. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения аналита в образце, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(II) проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первым концом хроматографической среды;

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий абсорбер для поглощения жидкости, отделенный от зоны приготовления образца на втором противоблоке; и

(в) зону приготовления образца для введения анализируемого образца, размещаемую либо на первом, либо на втором противоблоках;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что когда они не установлены друг против друга, образец может быть нанесен в зону приготовления образца, а в результате установки указанных противоблоков друг против друга исследуемый образец прикладывается к проводнику для перетекания через него к первому концу хроматографической среды, а абсорбер в результате приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды для отвода отсюда жидкости, чтобы способствовать перетеканию жидкости от первого конца ко второму.

6. Устройство по п.5, отличающееся тем, что зона приготовления образца

располагается на втором противоблоке, а абсорбер отделен от указанной зоны приготовления образца.

7. Устройство по п.5, отличающееся тем, что зона приготовления образца находится на первом противоблоке и расположена так, что проводник находится с ней в действующем контакте и связывает ее и хроматографическую среду для предоставления возможности жидкости течь от указанной зоны приготовления образца через проводник и через первый конец хроматографической среды, и, кроме того, второй противоблок включает аппликатор для нанесения жидкости в зону приготовления образца на первом противоблоке, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга, содержащий специфически связывающийся с аналитом партнер, меченный с помощью детектируемой метки, в перерастворимой добавлении к аппликатору водной фазы форме.

8. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения аналита в образце, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(II) проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первым концом хроматографической среды; и

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий:

(I) первый аппликатор для приложения жидкости к проводнику на первом противоблоке, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга, и содержащий аппликаторную подложку для образца для введения образца, когда первый и второй противоблоки не установлены друг против друга;

(II) второй аппликатор, отделенный на втором противоблоке от первого аппликатора, используемого для приложения жидкости к проводнику на первом противоблоке, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга, и содержащий детекторную аппликаторную подложку, на которую может быть нанесен по меньшей мере один детектирующий реагент для обнаружения аналита; и

(III) абсорбер для поглощения им жидкости, отделенный на втором противоблоке от первого и второго аппликаторов, при этом первый и второй аппликаторы расположены на втором противоблоке так, что не приходят в действующий контакт друг с другом, если первый и второй противоблоки не установлены друг против друга, а абсорбер расположен на втором противоблоке так, что находится в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды, если первый и второй противоблоки установлены друг против друга;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга проводник на первом противоблоке приходит в действующий контакт с первым и вторым аппликаторами на втором противоблоке,

посредством чего содержимое аппликаторной подложки для образца и детекторной аппликаторной подложки наносится на проводник первого противоблока, а потоку через проводник и хроматографическую среду способствует поглощение жидкости абсорбером.

9. Устройство по п.8, отличающееся тем, что детекторная аппликаторная подложка на втором противоблоке содержит первый специфически связывающийся с аналитом партнер, меченный детектируемой меткой, в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к детекторной аппликаторной подложке, и, кроме того, хроматографическая среда на первом противоблоке дополнительно включает зону обнаружения, площадь которой меньше площади хроматографической среды, и содержащую иммобилизованный на ней второй специфически связывающийся с аналитом партнер, в результате чего, если в образце присутствует аналит, в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий первый специфически связывающийся партнер, аналит и второй специфически связывающийся партнер.

10. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения аналита в образце, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(II) детекторную аппликаторную подложку, содержащую по меньшей мере один реагент для обнаружения аналита в действующем контакте с первым концом хроматографической среды; и

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий:

(I) аппликаторную подложку для образца для нанесения туда образца;

(II) абсорбер для поглощения жидкости, отделенный от аппликаторной подложки для образца на втором противоблоке;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что когда они не установлены друг против друга, образец может быть нанесен на аппликаторную подложку для образца на втором противоблоке, и что в результате установки их друг против друга:

(1) образец, находящийся в аппликаторной подложке для образца на втором противоблоке, прикладывается к детекторной аппликаторной подложке на первом противоблоке и таким образом к первому концу хроматографической среды; и

(2) абсорбер на втором противоблоке находится в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды на первом противоблоке и, поглощая жидкость, способствует ее потоку через проводник и хроматографическую среду.

11. Устройство по п.10, отличающееся тем, что оно дополнительно содержит проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первым концом хроматографической среды, расположенный в прямом контакте с детекторной аппликаторной подложкой, таким образом

находящейся в непрямом контакте с первым концом хроматографической среды.

12. Устройство по п.11, отличающееся тем, что детекторная аппликаторная подложка на первом противоблоке содержит первый специфически связывающийся с аналитом партнер, меченный детектируемой меткой, в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к детекторной аппликаторной подложке, и, кроме того, хроматографическая среда на первом противоблоке включает зону обнаружения, площадь которой значительно меньше площади хроматографической среды, и содержащую иммобилизованного на ней второй специфически связывающийся с аналитом партнер, в результате чего, если в образце присутствует аналит, в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий первый специфически связывающийся партнер, аналит и второй специфически связывающийся партнер.

13. Устройство по п.10, отличающееся тем, что детекторная аппликаторная подложка находится в прямом контакте с первым концом хроматографической среды и первый и второй противоблоки сконструированы так, что установка их друг против друга приводит в контакт детекторную аппликаторную подложку и аппликаторную подложку для образца, за исключением области детекторной аппликаторной подложки, непосредственно примыкающей к первому концу хроматографической среды, для перетекания жидкости от аппликаторной подложки для образца к детекторной аппликаторной подложке, в то же время сводя к минимуму перетекание жидкости от аппликаторной подложки для образца прямо в хроматографическую среду.

14. Устройство по п.13, отличающееся тем, что детекторная аппликаторная подложка на первом противоблоке содержит первого специфически связывающегося с аналитом партнера, меченного детектируемой меткой, в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к детекторной аппликаторной подложке, и, кроме того, хроматографическая среда на первом противоблоке включает зону обнаружения, площадь которой значительно меньше площади хроматографической среды, содержащую иммобилизованный на ней второй специфически связывающийся с аналитом партнер, в результате чего, если в образце присутствует аналит, в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий первый специфически связывающийся партнер, аналит и второй специфически связывающийся партнер.

15. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения аналита в образце, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(II) проводник для прохождения жидкости, расположенный на первом противоблоке;

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий:

(I) первый аппликатор для нанесения

жидкости на проводник первого противоблока, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга, причем проводник расположен так, что, если указанные противоблоки не установлены друг против друга, он не находится в действующем контакте с первым концом хроматографической среды;

(II) второй аппликатор, отделенный на втором противоблоке от первого аппликатора, для нанесения жидкости на проводник первого противоблока, когда указанные противоблоки установлены друг против друга; и

(III) абсорбер для поглощения жидкости, отделенный на втором противоблоке от первого и второго аппликаторов, располагаемых на втором противоблоке так, что они не находятся в действующем контакте друг с другом, если указанные противоблоки не установлены друг против друга;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга:

(1) проводник на первом противоблоке приходит в действующий контакт с первым аппликатором и вторым аппликатором, а второй аппликатор приходит в действующий контакт с первым концом хроматографической среды для нанесения содержимого первого и второго аппликаторов на хроматографическую среду; и

(2) абсорбер на втором противоблоке приходит в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды и, поглощая жидкость, способствует протеканию жидкости от первого и второго аппликаторов через проводник и хроматографическую среду.

16. Устройство по п. 15, отличающееся тем, что первый аппликатор на втором противоблоке включает аппликаторную подложку для образца для нанесения на нее образца, когда первый и второй противоблоки не установлены друг против друга, а второй аппликатор на втором противоблоке включает детекторную аппликаторную подложку, на которую может быть нанесен по меньшей мере один детектирующий реагент, посредством чего после установки первого и второго противоблоков друг против друга содержимое аппликаторной подложки для образца и детекторной аппликаторной подложки наносится на хроматографическую среду через проводник.

17. Устройство по п.16, отличающееся тем, что детекторная аппликаторная подложка на втором противоблоке содержит первый специфически связывающийся с аналитом партнер, меченный детектируемой меткой, в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к детекторной аппликаторной подложке, и, кроме того, хроматографическая среда на первом противоблоке включает зону обнаружения, площадь которой значительно меньше, чем площадь хроматографической среды, содержащую иммобилизованного на ней второго специфически связывающегося с аналитом партнера, в результате чего, если в образце присутствует аналит, в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий первый специфически связывающийся партнер, аналит и второй специфически связывающийся партнер.

18. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения аналита в образце, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы;

(II) проводник для прохождения жидкости в действующем контакте с первым концом хроматографической среды;

(III) абсорбер для поглощения жидкости в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды; и

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий аппликатор для нанесения жидкости на проводник первого противоблока, когда указанные противоблоки установлены друг против друга, причем аппликатор разделен на два сектора:

(I) первый сектор, содержащий первый специфически связывающийся с аналитом партнер, меченный детектируемой меткой, в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к аппликатору, когда первый и второй противоблоки не установлены друг против друга; и

(II) второй сектор, не имеющий первого специфически связывающегося с аналитом партнера;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга первый, но не второй, сектор аппликатора на втором противоблоке располагается в прямом контакте с проводником на первом противоблоке, второй сектор аппликатора при этом находится в непрямом контакте с проводником через первый сектор, чтобы нанести содержимое сначала первого и следом за ним второго сектора аппликатора на хроматографическую среду, при этом абсорбер удаляет жидкость из хроматографической среды, тем самым способствуя ее перетеканию из аппликатора через проводник и хроматографическую среду.

19. Устройство по п.18, отличающееся тем, что, кроме того, хроматографическая среда на первом противоблоке включает зону обнаружения, площадь которой значительно меньше площади хроматографической среды, содержащую иммобилизованный на ней второй специфически связывающийся с аналитом партнер, в результате чего, если в образце присутствует аналит, в зоне обнаружения образуется тройной комплекс, включающий первый специфически связывающийся партнер, аналит и второй специфически связывающийся партнер.

20. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения иммунологически моновалентного аналита в образце посредством конкурентного иммуноанализа, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованного на ней в дискретной области, площадь которой значительно меньше площади хроматографической среды, аналит или его

иммунологический аналог;

(II) первый проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первым концом хроматографической среды;

(III) второй проводник для приведения жидкости в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды;

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные первый и второй противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий первый аппликатор для приложения жидкости к первому проводнику на первом противоблоке, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга, причем первый аппликатор содержит первый специфически связывающийся с аналитом партнер в форме, которая может быть перерастворена добавлением первой водной фазы к первому аппликатору; и

(в) третий противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные первый и третий противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от третьего противоблока к первому, и включающий:

(I) второй аппликатор для нанесения жидкости на второй проводник первого противоблока, когда первый и третий противоблоки установлены друг против друга, содержащий второй специфически связывающийся с аналитом партнер, меченный детектируемой меткой, в форме, которая может быть перерастворена добавлением второй водной фазы ко второму аппликатору; и

(II) абсорбер для поглощения жидкости, отделенный на третьем противоблоке от второго аппликатора;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга первый проводник первого противоблока размещается в действующем контакте с первым аппликатором второго противоблока, посредством чего содержимое первого аппликатора наносится на хроматографическую среду через первый проводник и переносится по меньшей мере через часть хроматографической среды; а первый и третий противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга абсорбер третьего противоблока размещается в действующем контакте с первым проводником первого противоблока для отвода жидкости из хроматографической среды через первый проводник, а второй аппликатор третьего противоблока приходит в действующий контакт со вторым проводником первого противоблока, посредством чего содержимое второго аппликатора наносится на хроматографическую среду и переносится по меньшей мере через часть хроматографической среды, перекрывающей ту ее часть, через которую переносится содержимое первого аппликатора после приведения первого и второго противоблоков в контакт с хроматографической средой.

21. Устройство по п.20, отличающееся тем, что первый и второй специфически связывающиеся партнеры представляют собой специфические к аналиту антитела, а

иммобилизованный аналит или его аналог представляют собой аналит, ковалентно связанный с белком, лишенным специфически связывающейся активности к указанному аналиту.

22. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения иммунологически моновалентного аналита в образце посредством конкурентного иммуноанализа, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованных на ней в разделенных, дискретных и неперекрывающихся областях, площадь каждой из которых значительно меньше площади хроматографической среды;

(А) специфически связывающийся с аналитом партнер,

(Б) вторичный специфически связывающийся партнер, способный к связыванию элемента специфически связывающейся пары, лишенного аффинности к аналиту, и расположенного ближе к первому концу хроматографической среды, чем специфически связывающийся партнер к аналиту;

(I) первый проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первым концом хроматографической среды;

(II) второй проводник для приведения жидкости в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды; и

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий:

(I) аппликатор для приложения жидкости ко второму проводнику, когда первый и второй противоблоки установлены друг против друга, содержащий аналог аналита, который представляет собой аналит, ковалентно связанный с элементом специфически связывающейся пары, лишенным аффинности к аналиту и способным к связыванию вторичным специфически связывающимся партнером, при этом указанный элемент специфически связывающейся пары метят детектируемой меткой, а аналог аналита существует в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к аппликатору; и

(II) абсорбер для поглощения жидкости, отделенный от аппликатора на втором противоблоке;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга второй проводник размещается в действующем контакте с аппликатором, посредством чего содержимое аппликатора прикладывается к хроматографической среде и переносится по меньшей мере через часть хроматографической среды, а абсорбер размещается в действующем контакте с первым проводником для отвода жидкости с хроматографической среды.

23. Устройство по п.22, отличающееся тем, что оно дополнительно содержит крышку, прикрепленную шарнирно к первому противоблоку так, что ее можно наложить на первый и второй противоблоки, когда они установлены друг против друга, и имеющую



отверстие для наблюдения по меньшей мере за частью хроматографической среды, когда противоблоки установлены друг против друга и крышка наложена на первый и второй противоблоки.

24. Устройство по п.22, отличающееся тем, что первый специфически связывающийся партнер представляет собой специфичное к аналиту антитело, а вторичный специфически связывающийся партнер - второе антитело, способное к связыванию антитела, лишенного специфичности к аналиту, а аналог аналита представляет собой аналит, ковалентно связанный с иммуноглобулином.

25. Устройство по п.22, отличающееся тем, что область вторичного специфически связывающегося партнера, иммобилизованного на хроматографической среде, разделена по меньшей мере на две дискретные и неперекрывающиеся полосы с определенным количеством вторичного специфически связывающегося партнера в каждой, таким, что количество аналога аналита, связывающегося с зоной обнаружения, а также концентрация аналита в исследуемом образце определяются числом полос, с которыми связывается аналог аналита.

26. Устройство по п.22, отличающееся тем, что первый проводник способен функционировать как первый аппликатор, поэтому аппликатор второго противоблока является и вторым аппликатором, а указанное устройство дополнительно содержит третий противоблок, включающий второй абсорбер для поглощения жидкости; причем первый и третий противоблоки сконструированы так, что в результате установки первого и третьего противоблоком друг против друга второй абсорбер размещается в прямом контакте с первым проводником и с хроматографической средой для отвода жидкости с хроматографической среды через первый проводник.

27. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения иммунологически моновалентного аналита в образце посредством конкурентного иммуноанализа, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованных на ней в разделенных, дискретных неперекрывающихся областях, площадь каждой из которых значительно меньше площади хроматографической среды:

(А) вещество, способное к специфическому связыванию биотина, выбранное из группы, состоящей из авидина, стрептавидина, антибиотинового антитела и их производных; и

(Б) вторичной специфически связывающийся партнер, способный к специфическому связыванию с трехкомпонентным комплексом, содержащим: 1) аналит; (2) элемент специфически связывающейся пары, лишенный специфически связывающейся аффинности к аналиту и ковалентно связанный с ним; и (3) детектируемую метку, связанную с элементом специфически связывающейся пары;

(II) первый проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первым

концом хроматографической среды;

(III) второй проводник для приведения жидкости в действующий контакт со вторым концом хроматографической среды;

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные первый и второй противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий первый аппликатор для приложения жидкости к первому проводнику, содержащий первый специфически связывающийся с аналитом партнер, ковалентно связанный с биотином и не способный быть связанным вторичным специфически связывающимся партнером, в форме, которая может быть перерастворена добавлением водного образца к первому аппликатору; и

(в) третий противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные первый и третий противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от третьего противоблока к первому, и включающий:

(I) второй аппликатор для приложения жидкости ко второму проводнику, содержащий трехкомпонентный комплекс, существующий в форме, которая может быть перерастворена добавлением второй водной фазы ко второму аппликатору; и

(II) абсорбер для поглощения жидкости, отделенный от второго аппликатора на третьем противоблоке;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга первый проводник размещается в действующем контакте с первым аппликатором, посредством чего содержимое первого аппликатора прикладывается к хроматографической среде и переносится по меньшей мере через часть хроматографической среды; а первый и третий противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга абсорбер размещается в контакте с первым проводником для отвода жидкости из хроматографической среды, а второй аппликатор приходит в действующий контакт со вторым проводником, посредством чего содержимое второго аппликатора прикладывается к хроматографической среде и переносится по меньшей мере через часть хроматографической среды, перекрывающей ту часть ее, через которую переносится содержимое первого аппликатора.

28. Устройство по п.27, отличающееся тем, что первый специфически связывающийся партнер является антителом к аналиту, элемент специфически связывающейся пары в трехкомпонентном комплексе является иммуноглобулином G кролика, а второй специфически связывающийся партнер - козым анти-(IgG кролика), а веществом, способным к специфическому связыванию с биотином, является стрептавидин.

29. Устройство по п.27, отличающееся тем, что область вторичного специфически связывающегося партнера, иммобилизованного на хроматографической среде, разделена по меньшей мере на две дискретные и неперекрывающиеся полосы, каждая из которых содержит определенное

количество вторичного специфически связывающегося партнера, такое, что количество трехкомпонентного комплекса, связывающегося с зоной обнаружения, и таким образом исходная концентрация аналита в исследуемом образце, определяются числом полос, с которыми связывается трехкомпонентный комплекс.

30. Устройство для хроматографического анализа для обнаружения и/или определения иммунологически моновалентного аналита в образце посредством конкурентного иммуноанализа, отличающееся тем, что оно содержит:

(а) первый противоблок, включающий:

(I) хроматографическую среду, имеющую первый и второй концы и иммобилизованных на ней в разделенных и неперекрывающихся дискретных областях, площадь каждой из которых значительно меньше площади хроматографической среды;

(А) аналог аналита, способный к связыванию со специфически связывающимся партнером к аналиту; и

(Б) вторичной специфически связывающийся партнер, который способен связываться с элементом специфически связывающейся пары, обладающим аффинностью к аналиту, при этом сам вторичный специфически связывающийся партнер не имеет связывающей аффинности к аналиту; и

(II) проводник для приведения жидкости в действующий контакт с первым концом хроматографической среды; и

(б) второй противоблок, прикрепляемый к первому противоблоку так, что указанные противоблоки устанавливаются друг против друга, а жидкость передается от второго противоблока к первому, и включающий аппликатор, содержащий меченный специфически связывающийся с аналитом партнер в форме, которая может быть перерастворена добавлением водной фазы к аппликатору;

причем первый и второй противоблоки сконструированы так, что в результате установки их друг против друга проводник размещается в действующем контакте с аппликатором, посредством чего содержимое аппликатора прикладывается к хроматографической среде и переносится по меньшей мере через хроматографической среды.

31. Устройство по п.30, отличающееся тем, что первый специфически связывающийся партнер является специфичным к аналиту антителом, аналог аналита представляет собой аналит, ковалентно связанный с белком, лишенным специфически связывающейся аффинности к аналиту или специфически связывающемуся партнеру аналита, а вторичный специфически связывающийся партнер связывает антитело, специфичное к аналиту, на основе видоспецифических взаимодействий, не вовлекающих антигенсвязывающий сайт антитела к аналиту.

32. Устройство по п.30, отличающееся тем, что первый противоблок дополнительно включает абсорбер для поглощения жидкости в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды, чтобы обеспечить перетекание жидкости через хроматографическую среду.

33. Устройство по п.30, отличающееся тем, что второй противоблок дополнительно включает абсорбер для поглощения жидкости, отделенный от аппликатора и расположенный на втором противоблоке так, что в результате установки указанных противоблоков друг против друга абсорбер размещается в действующем контакте со вторым концом хроматографической среды, чтобы обеспечить перетекание жидкости через хроматографическую среду.

34. Устройство по п.30, отличающееся тем, что область вторичного специфически связывающегося партнера, иммобилизованного на хроматографической среде, разделена по меньшей мере на две дискретные и неперекрывающиеся полосы, каждая из которых содержит определенное количество вторичного специфически связывающегося партнера, такое, что количество меченного специфически связывающегося с аналитом партнера, связывающегося с зоной обнаружения, и таким образом количество аналита в исследуемом образце, выражается числом полос, с которыми связывается меченый специфически связывающийся с аналитом партнер.

35. Устройство по пп.9, 17, 19, 20, 22, 26, 27 или 30, отличающееся тем, что детектируемая метка является визуально детектируемой.

Таблица 1

Схемы связывания для сэндвич-иммуноанализов

Аналит	1-й ССП (подвижный)	2-й ССП (фиксированный)	Вторичный ССП	Образующийся комплекс
Ag	At <sub>1</sub> *	At <sub>2</sub>	-	At <sub>1</sub> -Ag-At <sub>2</sub> *
Г	At <sub>1</sub> *	At <sub>2</sub>	-	At <sub>2</sub> -Г-At <sub>1</sub> * <sup>(1)</sup>
At	At <sub>1</sub> *	Ag	-	Ag-At-At <sub>1</sub> *
Ag	At <sub>1</sub>	At <sub>2</sub>	At <sub>2</sub> *	At <sub>2</sub> -Ag-At <sub>1</sub> -At <sub>2</sub> *
At	At <sub>1</sub>	Ag	At <sub>2</sub> *	Ag-At-At <sub>1</sub> -At <sub>2</sub> *
Ag	At <sub>1</sub> -Bn	At <sub>2</sub>	Ag-M	At <sub>2</sub> -Ag-At <sub>1</sub> -Bn-Ag-M

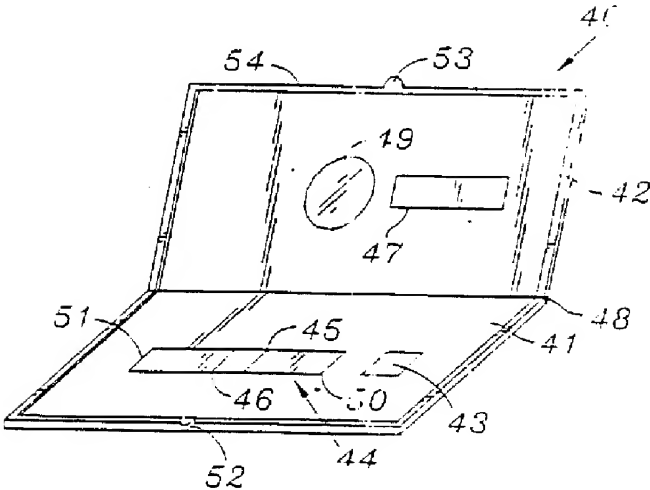
Ag = Антиген  
Г = Гаптен  
At = Антитело  
At<sub>1</sub> = 1-е антитело  
At<sub>2</sub> = 2-е антитело  
At<sub>1</sub>, At<sub>1</sub>\*, At<sub>2</sub> = антитела, специфичные к другому антителу  
Bn = Биотин  
Aw = Авидин  
M = Метка  
\* Обозначает меченый компонент  
(1) At<sub>2</sub> и At<sub>1</sub>\* предпочтительно связываются с различными гаптенами;  
не все гаптены обладают такими различными эпитопами.

Таблица 2

Схемы связывания для конкурентных анализов

I	Нанесенные на хроматографи-ческую среду		Фиксирован. на хроматографи-ческой среде		Связанные в присутствии аналита		Связанные при отсутствии аналита	
	1-й сайт, напр. Г-At <sub>1</sub> или At	2-й сайт, напр. At <sub>2</sub> =M	1-й сайт	2-й сайт	1-й сайт	2-й сайт	1-й сайт	2-й сайт
II	Г или Г-At <sub>1</sub>	Г-Ig=M	Г	---	Г-At <sub>2</sub> =M	---	Г-At	---
III	Г-At <sub>1</sub> или At=Bi или At=Aw	Г-Ig=M	Atв	Aw	Atв: Г-Ig=M Atв: Г-Ig=M	Г-At <sub>1</sub> = Bi-Aw	Atв	M-Ig=Г-Atв Bi=Aw
IV	Г-At=M или At=M	---	Atв	Г	Atв: Г-At <sub>1</sub> =M	Г	Atв	Г-At=M

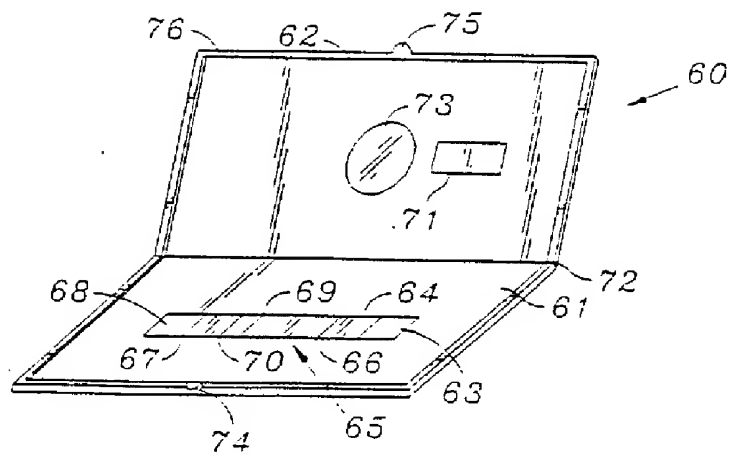
Г : Гаптен  
At<sub>1</sub>, At<sub>2</sub> : Первый и второй антитела, специфичные к гаптenu  
Ig : Иммуноглобулин, лишенный специфической связывающей активности  
Atв : Вторичное антитело, связывающее At<sub>1</sub> и At<sub>2</sub>  
Bi : Биотин  
Aw : Авидин  
M : Метка  
- : Нековалентная связь  
= : Ковалентная связь



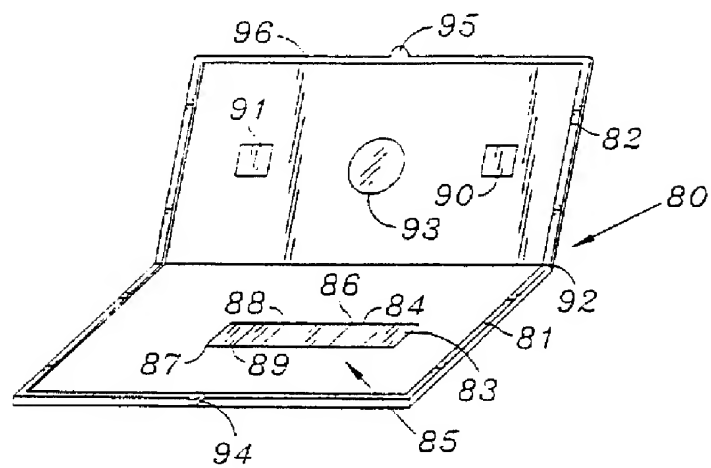
Фиг.2

RU 2124729 C1

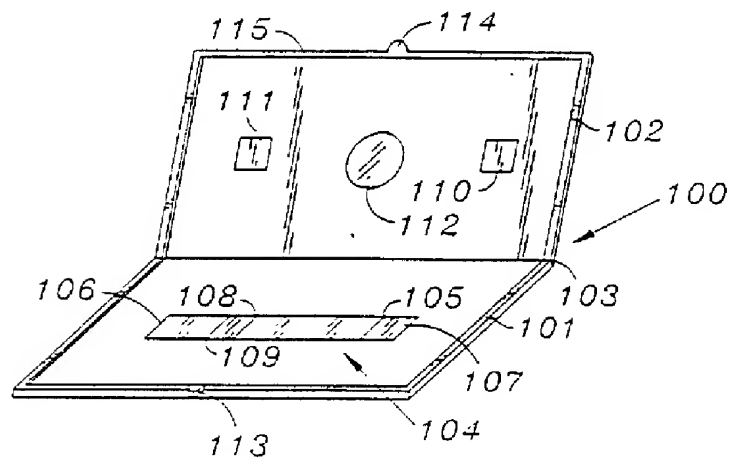
RU 2124729 C1



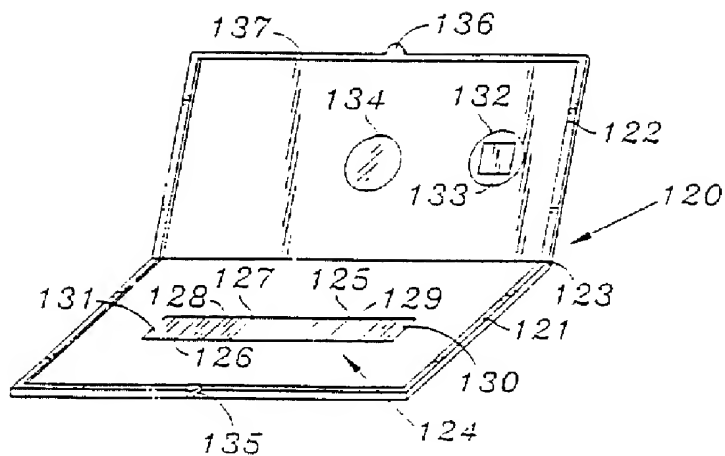
Фиг.3



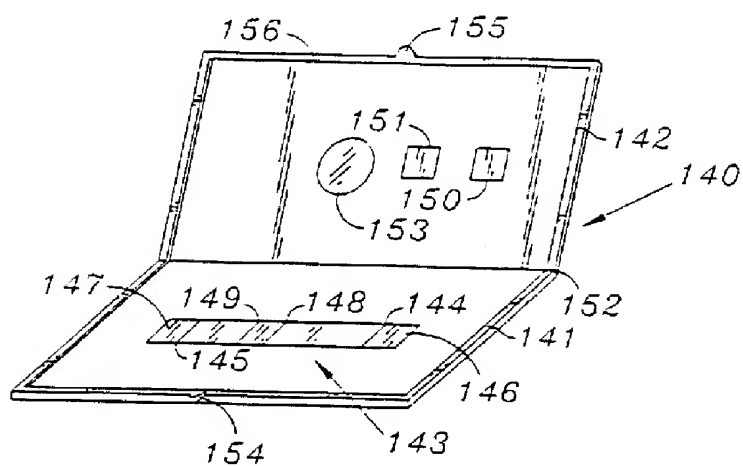
Фиг.4



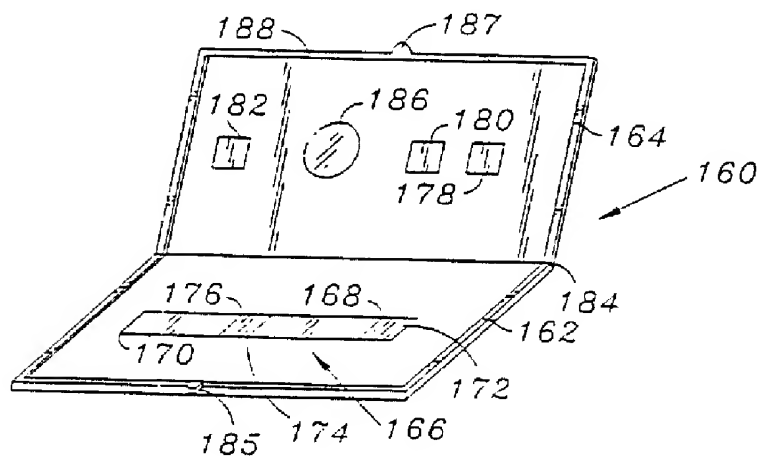
Фиг.5



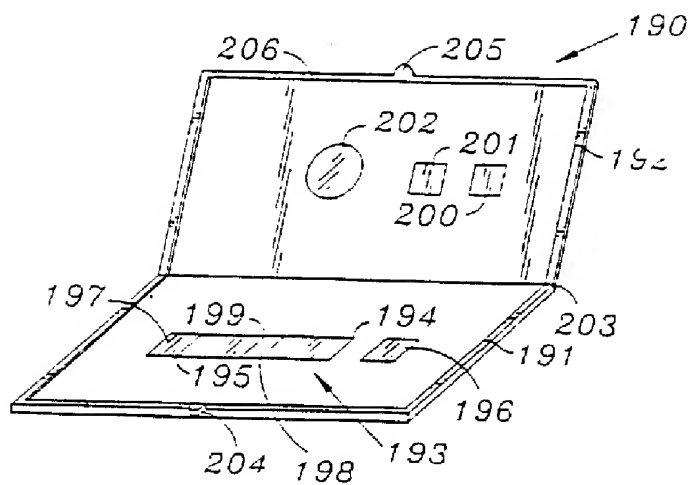
**Фиг.6**



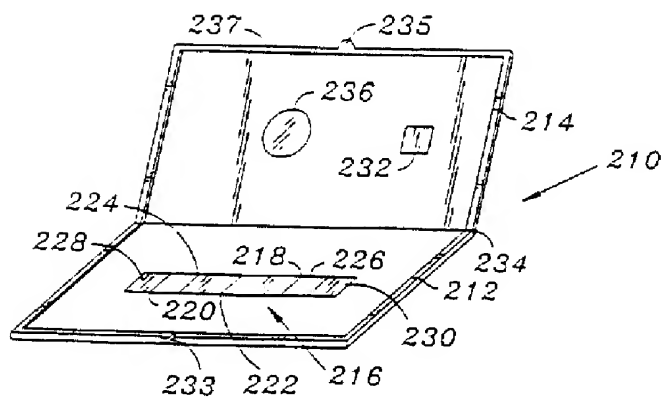
**Фиг.7**



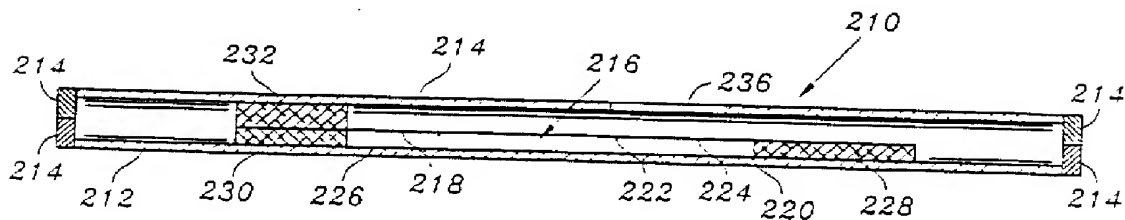
**Фиг.8**



Фиг.9



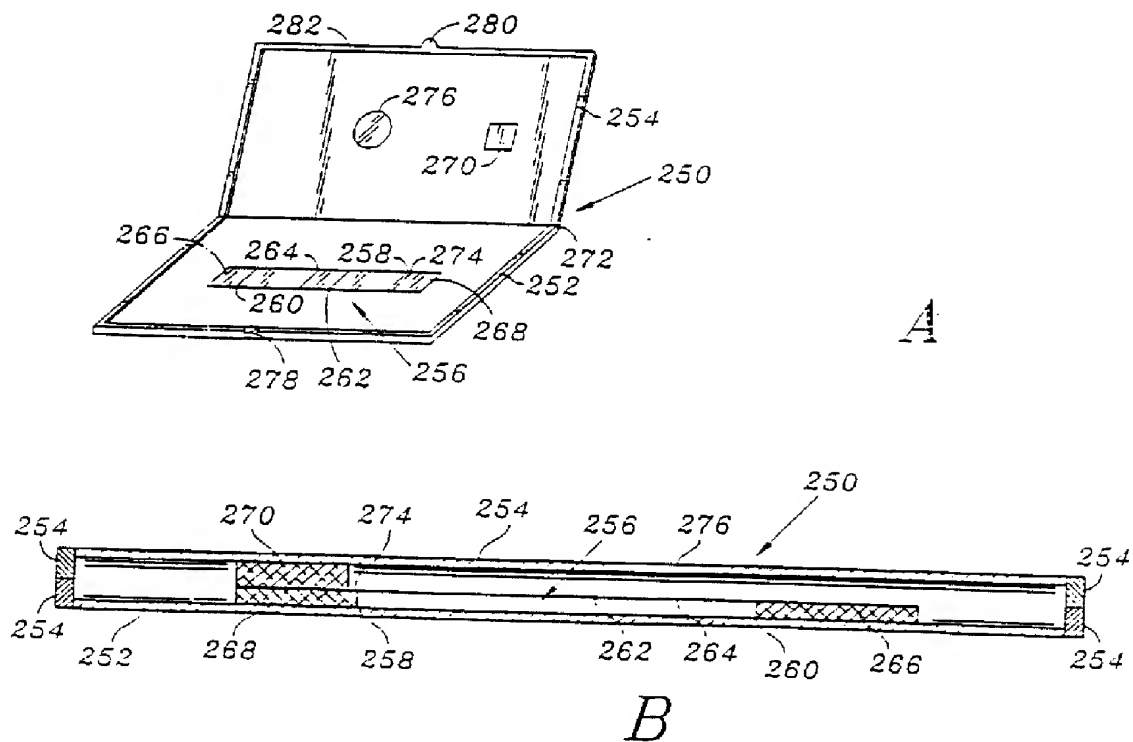
A



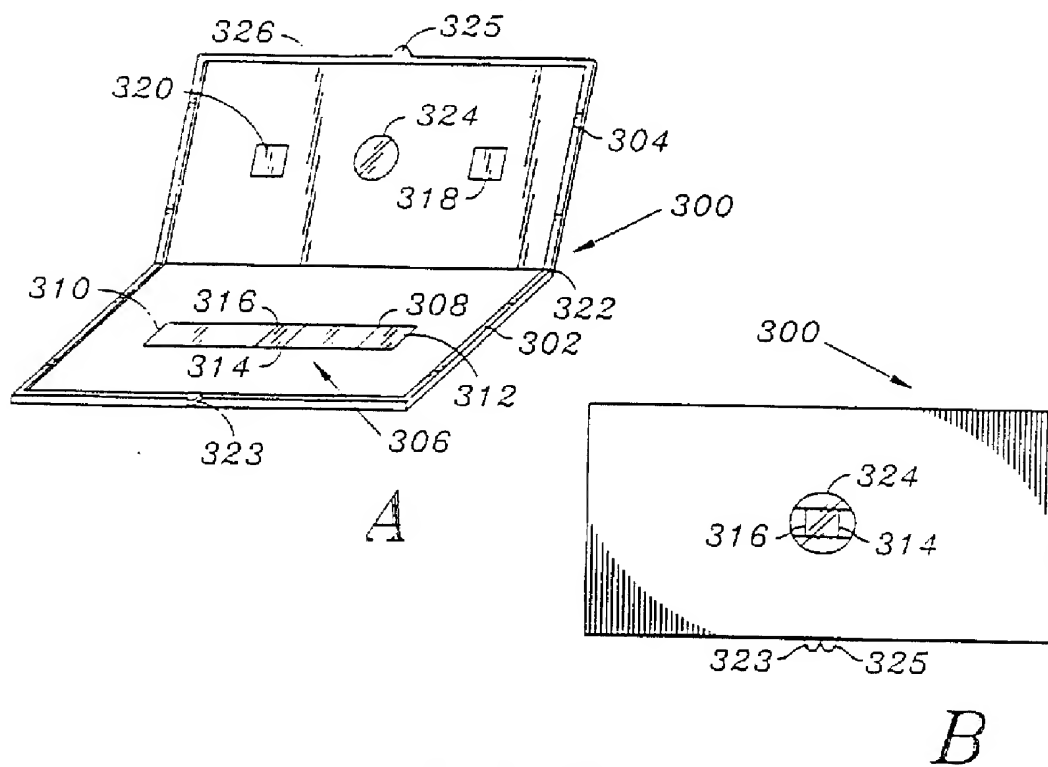
B

Фиг.10

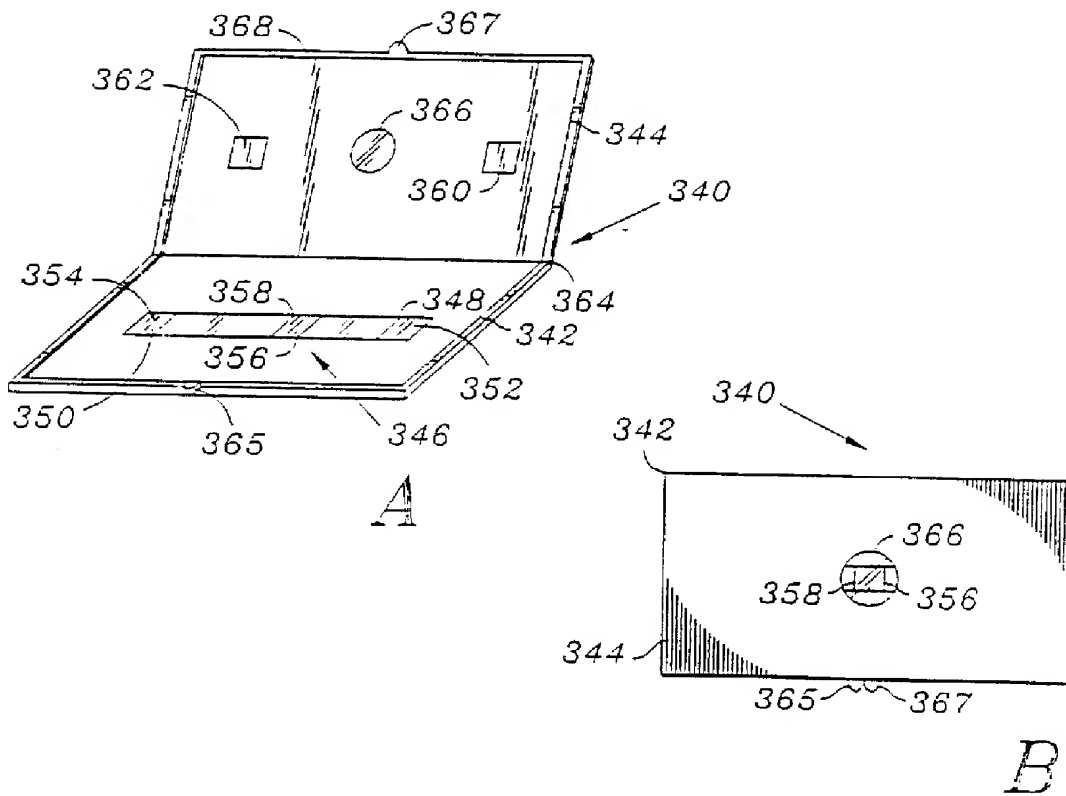




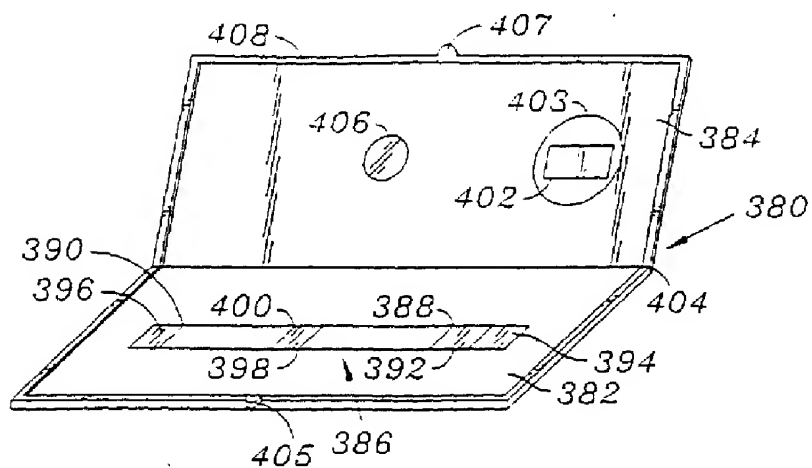
Фиг.11



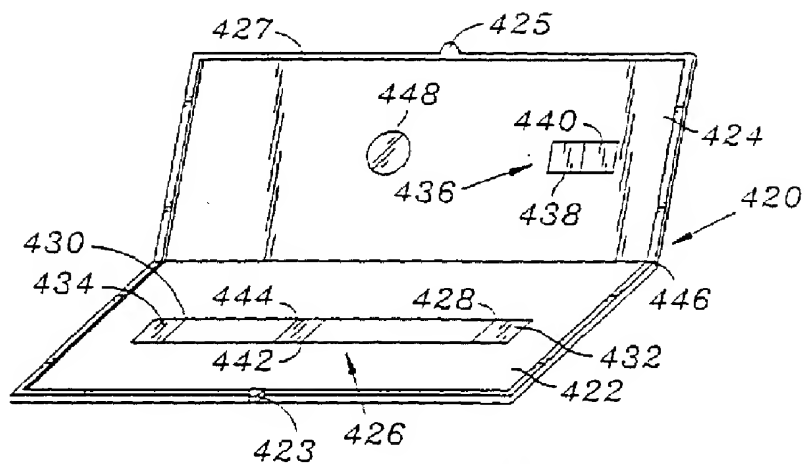
Фиг.12



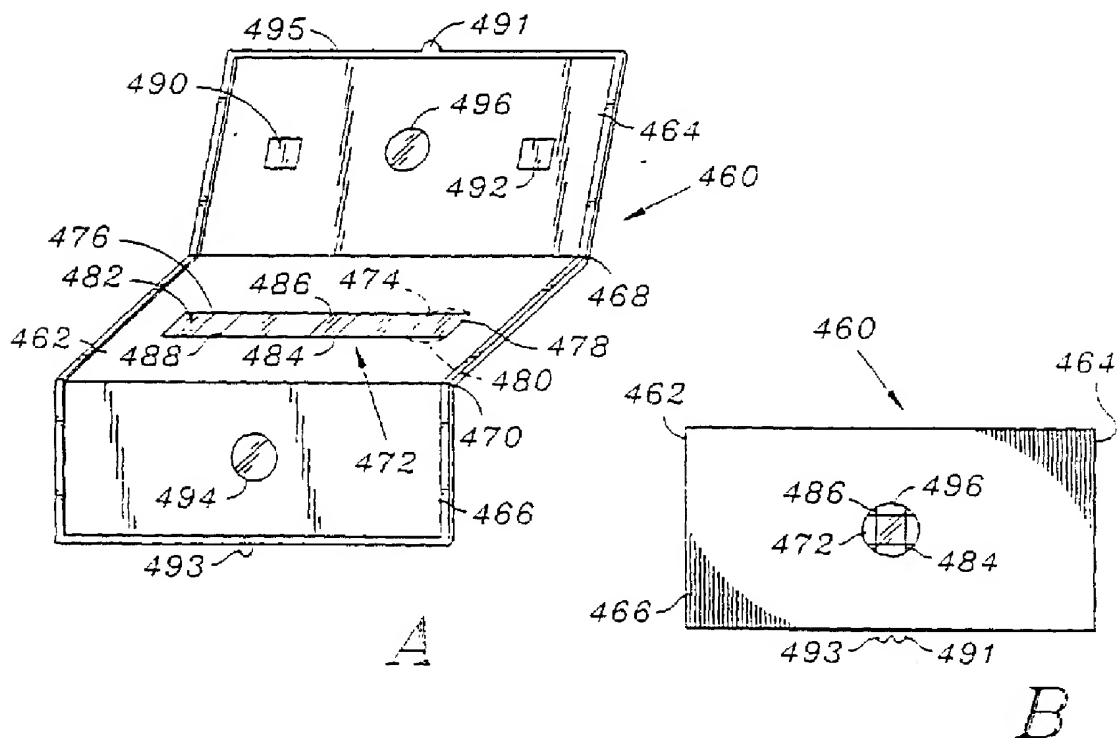
Фиг.13



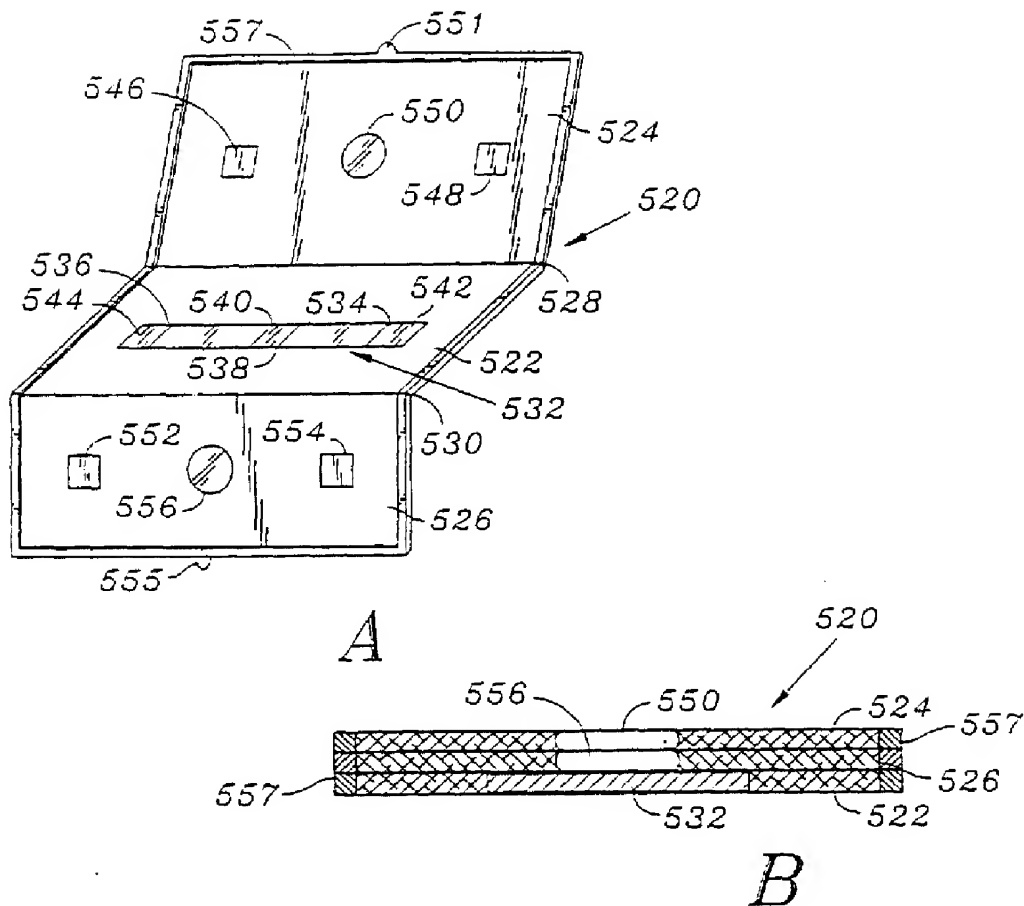
Фиг.14



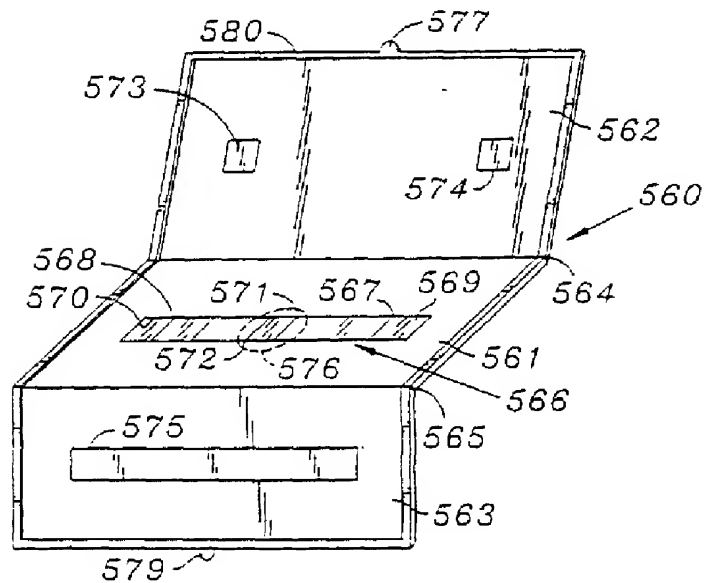
Фиг.15



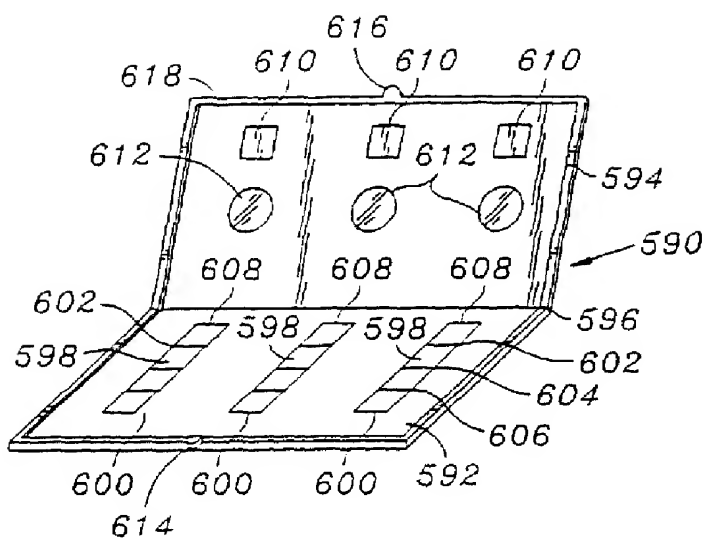
Фиг.16



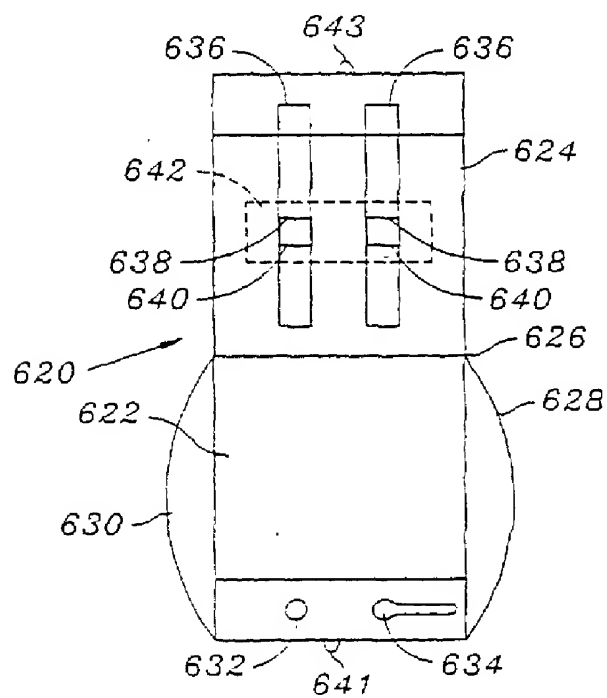
Фиг.17



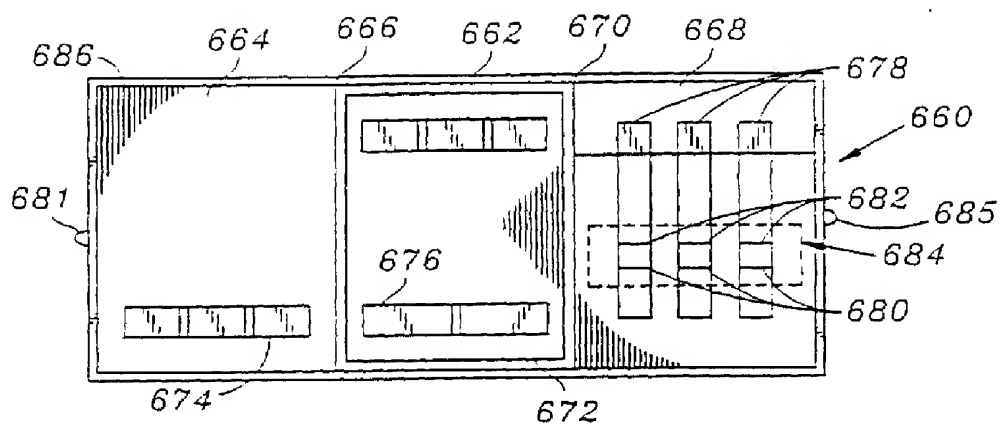
Фиг.18



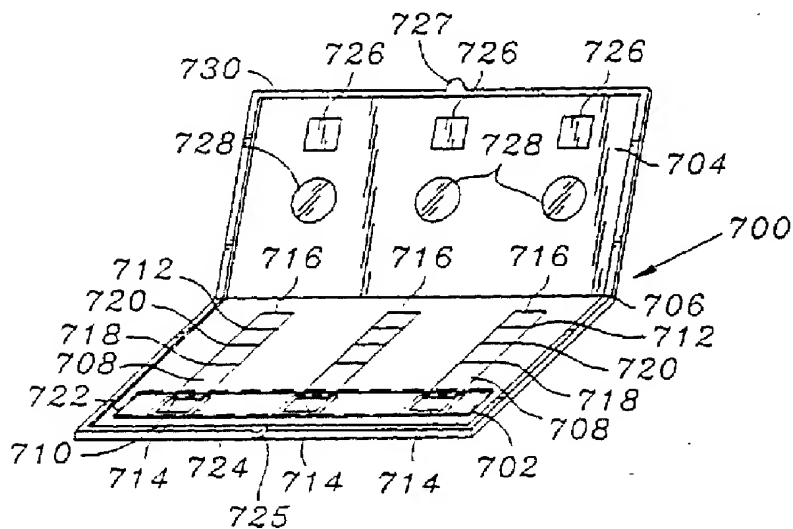
Фиг.19



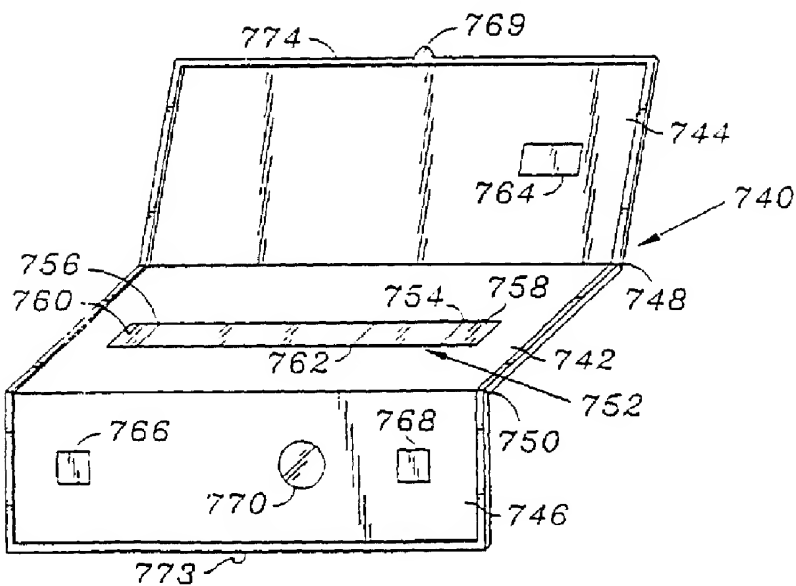
Фиг.20



Фиг.21

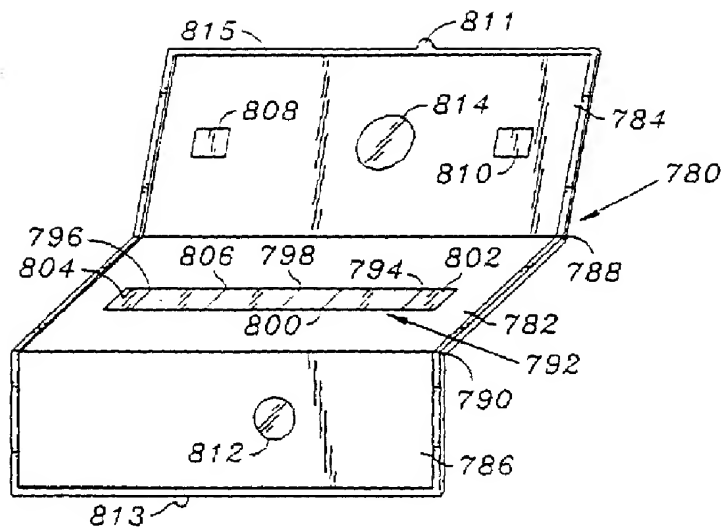


Фиг.22

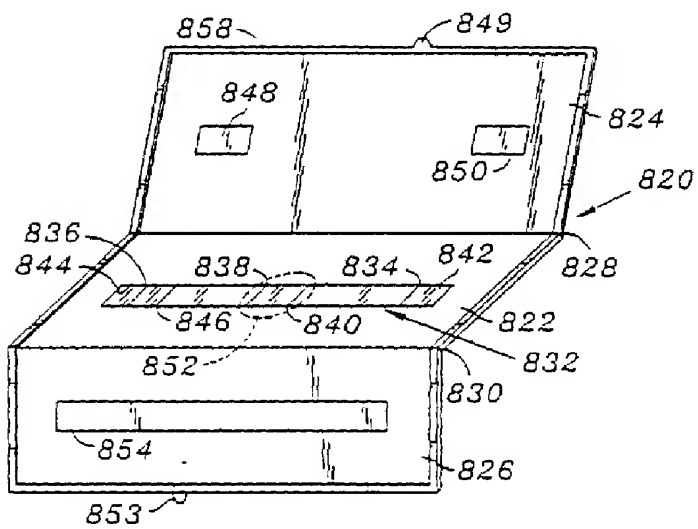


Фиг.23

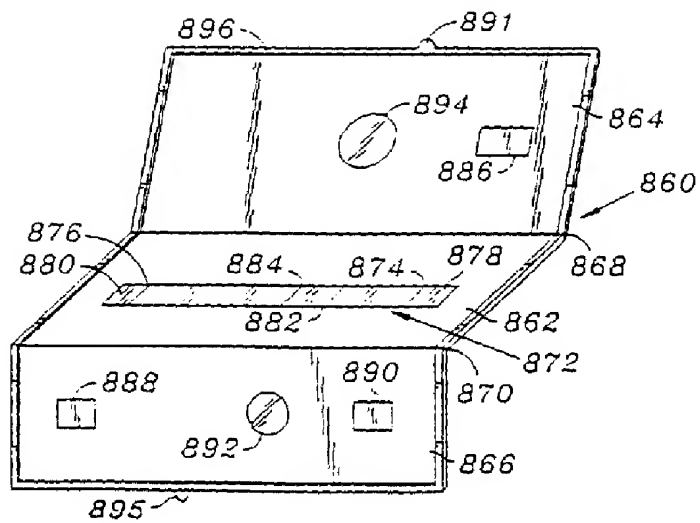




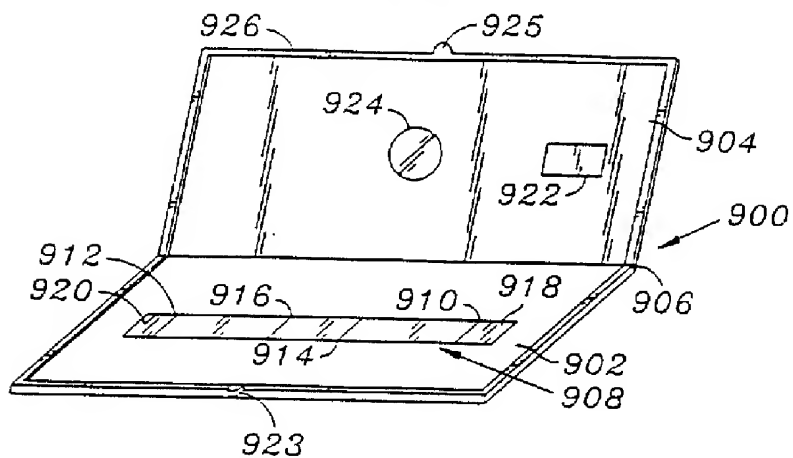
Фиг.24



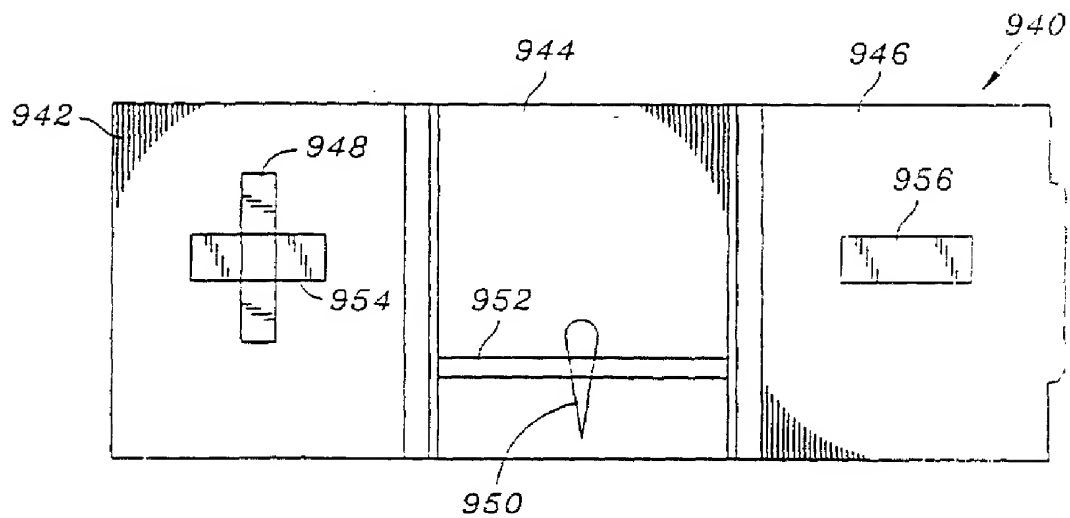
Фиг.25



Фиг.26



Фиг.27



Фиг.28